

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE  
EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR  
MARTINE GIRARD**

**EFFET DE L'INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE (IP6)  
SUR LES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES DU CERVEAU**

**14 DÉCEMBRE 2001**

2090

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

*« Ce n'est pas assez de faire des pas qui doivent un jour conduire au but, chaque pas doit être en lui-même un but en même temps qu'il nous porte en avant. »*

Goethe

Guy, tu m'as offert une première chance en or et tu as su faire naître en moi la passion de la recherche; te remercier mille fois n'est encore que trop peu. Alucard, ton support technique, tes sages recommandations et ton oreille attentive, tout ça m'est très précieux. Luc, je te témoigne ma plus grande reconnaissance pour ta critique enrichissante de ma prose scientifique. Othman, quoi dire de plus sinon qu'avec toutes tes gentilles petites attentions tu fus un véritable frère pour moi. Barbara, toi dont la bonté n'a d'égal que la détermination, mes plus sincères amitiés. Judith, j'ai appris à te connaître et à t'apprécier, toi et ta spontanéité. Joël, tu as toujours défendu tes convictions avec l'ardeur et la passion qui te caractérisent si bien ; je défendrai maintenant les miennes à tes côtés. Chers parents, ma reconnaissance est le reflet de votre fierté. À vous tous qui avez supporté mes matins ensoleillés et mes après-midi parfois orageux, mes plus tendres et sincères remerciements.

## RÉSUMÉ

L'inositol hexakisphosphate (IP6) est l'un des inositols les plus abondants dans les cellules. Autrefois considérée comme une molécule métaboliquement inerte, l'IP6 serait un intervenant de premier ordre dans le trafic vésiculaire et dans la compartimentation cellulaire. Dans le cadre de la présente étude, l'autoradiographie quantitative, le fractionnement subcellulaire ainsi que l'immunobuvardage sont utilisées afin de caractériser les effets de l'IP6 sur les récepteurs de type AMPA et NMDA. Les analyses qualitative et quantitative de la liaison du [<sup>3</sup>H]AMPA indiquent que l'incubation de coupes de cerveaux de rats avec de l'IP6 à 35°C engendre une augmentation de la liaison du récepteur AMPA. De plus, les études de saturation démontrent que l'augmentation de la liaison du récepteur AMPA en présence d'IP6 est causée par une augmentation du nombre de sites de liaison. Les études d'immunobuvardage révèlent quant à elles que l'IP6 augmente l'immunoréactivité pour les sous-unités GluR1 et GluR2/3 du récepteur AMPA dans la fraction synaptosomale (P2) de préparations neuronales membranaires. Cette augmentation dans la fraction synaptosomale est cohérente avec une baisse de l'immunoréactivité pour les mêmes sous-unités dans la fraction microsomale (P3). Fait intéressant, la modulation du récepteur AMPA induite par l'IP6 est bloquée à la température de la pièce de même que lors d'un prétraitement à l'héparine. Toutefois, les effets de l'IP6 semblent être spécifiques aux récepteurs AMPA puisque la liaison du [<sup>3</sup>H]-Glutamate au récepteur NMDA de même que l'immunoréactivité des sous-unités NR1 et NR2A n'est pas affectée. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'IP6 est en mesure de réguler de façon spécifique la distribution du récepteur AMPA, et ce, vraisemblablement à travers un processus tributaire de la clathrine.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix

CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 GÉNÉRALITÉS.....	1
1.2 ASPECTS MOLÉCULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE.....	4
1.2.1. LES RÉCEPTEURS MÉTABOTROPES DU GLUTAMATE.....	7
1.2.2. LES RÉCEPTEURS IONOTROPES KAÏNATE.....	8
1.2.3. LES RÉCEPTEURS IONOTROPES DE TYPE NMDA.....	8
1.2.4. LES RÉCEPTEURS IONOTROPES DE TYPE AMPA.....	11
1.2.4.1 Régulation des récepteurs AMPA.....	15
1.2.4.2 Distribution subcellulaire des récepteurs AMPA.....	17
1.3 REVUE DES PROCESSUS DE RECYCLAGE MEMBRANAIRES.....	18
1.3.1 ENDOCYTOSE DES RÉCEPTEURS.....	19
1.4 PROTÉINES ACCESSOIRES DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE.....	23
1.5 INTERACTIONS DES INOSITOLS PHOSPHATES AVEC L'ADAPTINE.....	27
OJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	30

CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	35
2.1 ÉTUDES DE RADIOLIAISON ET AUTORADIOGRAPHIE.....	35
2.1.0 Matériels.....	35
2.1.1 Préparation du tissu cérébral.....	35
2.1.2 Traitement des coupes.....	36
2.1.3 Étude des récepteurs AMPA par épreuve de liaison.....	36
2.1.4 Étude des récepteurs NMDA par épreuve de liaison.....	36
2.1.5 Autoradiographie.....	37
2.1.6 Analyses statistiques.....	37

2.2	ÉTUDES BIOCHIMIQUES DES RÉCEPTEURS AMPA ET NMDA.....	38
2.2.0	Matériels.....	38
2.2.1	Préparation du tissu cérébral.....	38
2.2.2	Traitement des coupes.....	39
2.2.3	Homogénéisation du tissu cérébral.....	39
2.2.4	Centrifugations différentielles des homogénats.....	39
2.2.5	Dosage des protéines par spectroscopie UV-visible.....	40
2.2.6	Électrophorèse SDS-Page.....	41
2.2.7	Analyse par transfert de type Western blot.....	41
	<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....</b>	<b>43</b>
3.1	ANALYSE QUALITATIVE DE L'EFFET DE L'IP6 SUR LES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES DE TYPE NMDA ET AMPA.....	43
3.2	ANALYSE QUANTITATIVE DE L'EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON DU [ <sup>3</sup> H]AMPA DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CERVEAU.....	44
3.2.1.	Effet de l'IP6 sur les propriétés de liaison des récepteurs AMPA dans l'hippocampe...	45
3.3	EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON SPÉCIFIQUE DU [ <sup>3</sup> H]GLUTAMATE DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CERVEAU.....	45
3.4	EFFET DE L'IP6 SUR LA DISTRIBUTION CELLULAIRE DES RÉCEPTEURS AMPA.....	46
3.5	EFFET DE L'IS6 SUR LA MODULATION DE LA SOUS-UNITÉ GLUR1 DU RÉCEPTEUR AMPA.....	47
3.6	EFFET DE L'IP6 SUR LA DISTRIBUTION CELLULAIRE DES RÉCEPTEURS NMDA.....	47
3.7	EFFET DE L'HÉPARINE ET DE L'ÉLASTASE SUR LA RÉGULATION DE LA LIAISON DU RÉCEPTEUR AMPA PAR L'IP6.....	48
3.8	EFFET DE L'HÉPARINE SUR LA MODULATION DE LA SOUS-UNITÉ GLUR1 DU RÉCEPTEUR AMPA PAR L'IP6.....	48
	<b>CHAPITRE 4 DISCUSSION.....</b>	<b>63</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>68</b>
	<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>70</b>

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 .	Principales propriétés pharmacologiques et physiologiques des récepteurs au glutamate.....	5
TABLEAU 2.	Les différentes sous-unités des récepteurs au glutamate de type ionotrope.....	6

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	SCHÉMA DU RÉCEPTEUR NMDA ET DE SES DIFFÉRENTS SITES DE LIAISONS PHARMACOLOGIQUES.....	9
FIGURE 2.	STRUCTURE DU RÉCEPTEUR AMPA ET DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE DE TYPE IONOTROPE.....	13
FIGURE 3.	ARRANGEMENT MOLÉCULAIRE DU RÉCEPTEUR AMPA.....	14
FIGURE 4.	LES DIFFÉRENTES RÉGIONS ET LES PRINCIPALES VOIES EXCITATRICES DE L'HIPPOCAMPE.....	15
FIGURE 5.	VÉSICULE TAPISSÉE DE CLATHRINE.....	19
FIGURE 6.	STRUCTURE DU TRISKÉLION, L'UNITÉ DE BASE DE LA CLATHRINE.....	20
FIGURE 7.	ENDOCYTOSE MÉDIÉE PAR LA CLATHRINE.....	22
FIGURE 8.	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE DE L'AP-2.....	22
FIGURE 9.	STRUCTURE DE L'INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE (IP6).....	28
FIGURE 10.	VOIE MÉTABOLIQUE SIMPLIFIÉE DES INOSITOLS.....	28
FIGURE 11.	EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS D'IP6 SUR LA LIAISON DU [ <sup>3</sup> H]AMPA.....	50
FIGURE 12.	EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA MODULATION INDUITE PAR L'IP6.....	51
FIGURE 13.	ASPECT QUALITATIF DE L'EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON SPÉCIFIQUE DU [ <sup>3</sup> H]AMPA DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS CÉRÉBRALES DU RAT.....	52
FIGURE 14.	L'EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON SPÉCIFIQUE DU [ <sup>3</sup> H]AMPA AU RÉCEPTEUR AMPA DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CERVEAU.....	53
FIGURE 15.	EFFET DE L'IP6 SUR LES PROPRIÉTÉS DE LIAISON DES RÉCEPTEURS AMPA DANS L'HIPPOCAMPE.....	54
FIGURE 16.	EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON DU [ <sup>3</sup> H]GLUTAMATE AU RÉCEPTEUR NMDA DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CERVEAU.....	55
FIGURE 17.	ASPECTS QUALITATIF ET QUANTITATIF DE L'EFFET DE L'IP6 SUR L'IMMUNORÉACTIVITÉ DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE DES DIFFÉRENTES SOUS-UNITÉS DU RÉCEPTEUR AMPA.....	56
FIGURE 18.	ASPECTS QUALITATIF ET QUANTITATIF DE L'EFFET DE L'IP6 SUR L'IMMUNORÉACTIVITÉ DE LA FRACTION MICROSOmale (P3) DES DIFFÉRENTES SOUS-UNITÉS DU RÉCEPTEUR AMPA.....	57
FIGURE 19.	EFFET DE L'IP6 SUR LA FRACTION SYNAPTOSOMALE (P2) DE LA SOUS-UNITÉ GluR1 DU RÉCEPTEUR AMPA.....	58
FIGURE 20.	ASPECTS QUALITATIF ET QUANTITATIF DE L'EFFET DE L'IP6 SUR L'IMMUNORÉACTIVITÉ DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE (P2) DES DIFFÉRENTES SOUS-UNITÉS DU RÉCEPTEUR NMDA.....	59
FIGURE 21.	ASPECTS QUALITATIF ET QUANTITATIF DE L'EFFET DE L'IP6 SUR L'IMMUNORÉACTIVITÉ DE LA FRACTION MICROSOmale (P3) DES DIFFÉRENTES SOUS-UNITÉS DU RÉCEPTEUR NMDA.....	60
FIGURE 22.	EFFET DE L'IP6, DE L'HÉPARINE ET DE L'ÉLASTASE SUR LA LIAISON SPÉCIFIQUE DU [ <sup>3</sup> H]AMPA AU RÉCEPTEUR AMPA.....	61



FIGURE 23. EFFET DE L'HÉPARINE SUR LA FRACTION SYNAPTOSOMALE (P2) DE LA SOUS-UNITÉ GluR1 DU RÉCEPTEUR AMPA.....	62
--	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABP	AMPA receptor binding protein
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
$^3\text{H}$ -AMPA	AMPA tritié
AP-1	adaptine-1
AP-2	adaptine-2
AP5 ou APV	D-amino-5-phosphopentanoate
AP7	D(-)-2-amino-7-phosphonoheptanoic acide
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
$\text{Ca}^{2+}$	calcium
CA (1-4)	corne d'Ammon
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
PCP	acide (2-carboxyperazine-4-yl) propyl-1-phosphonique
DAG	diacylglycérol
DG	gyrus dentatus
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
EGF	facteur de croissance de l'épiderme (epidermal growth factor)
FWD	(S)-5-fluorowillardiine
GLU	glutamate
GRIP	glutamate receptors interacting protein
$^3\text{H}$ -GLU	glutamate tritié
GluR1-4	sous-unités 1 à 4 du récepteur AMPA
GluR5-7	sous-unités 5 à 7 du récepteur kaïnate
GluRm	récepteur glutamatergique de type métabotrope
GYK153655	2,3-benzodiazépine

Ibo	ibotenate
IP <sub>3</sub>	inositol triphosphate
IP <sub>4</sub>	inositol tétrakisphosphate
IP <sub>5</sub>	inositol pentakisphosphate
IP <sub>6</sub>	inositol hexakisphosphate
IS <sub>6</sub>	inositol hexasulfate
KA	kaïnite
L-AP3	L-2-amino-3-phosphonopropionate
L-AP4	L-1-amino-4-phosphonobutanoate
LDL	lipoprotéine de faible densité (low density lipoprotein)
LTD	dépression à long terme (long-term depression)
LTP	potentialisation à long terme (long-term potentiation)
Mg <sup>2+</sup>	magnésium
MK-801	5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maléate
Na <sup>+</sup>	sodium
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NR1-NR2A-D	différentes sous-unités du récepteur NMDA
NT	neurotransmetteur
PIP2	phosphoinositol biphosphate
PCP	phencyclidine
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
Quis	quisqualate
SAP's	synapse-associated protein
SHF	stimulation électrique de haute fréquence
SNAP	synaptic NSF anchoring protein
SNC	système nerveux central
Zn <sup>2+</sup>	zinc

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 GÉNÉRALITÉS

Malgré les nombreux et récents progrès dans la technologie biomédicale, le cerveau demeure un organe complexe et relativement peu connu. Toutefois, les efforts déployés par les scientifiques sont considérables et, progressivement, l'anatomie, la biochimie et la physiologie de ce noble organe tendent à se préciser. L'évolution des connaissances relatives au cerveau a conduit les scientifiques à obtenir une meilleure compréhension des diverses fonctions cérébrales et des pathologies qui y sont associées. Derrière ces avancements de la connaissance, toute une épopée scientifique s'est déroulée, du début de l'exploration du tissu cérébral jusqu'à la description récente des mécanismes fins de la régulation des récepteurs pour le neurotransmetteur glutamate. Le présent mémoire vise à mettre en place quelques pièces dans l'immense puzzle de cette régulation.

À l'époque de Charles Darwin (1809-1882), les cellules nerveuses, ainsi que les multiples connections qu'elles établissent entre elles, étaient pratiquement inconnues. Ce n'est qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que la microanatomie du tissu cérébral fut révélée de façon précise. Ce sont les travaux de Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) qui firent la lumière sur les détails microanatomiques du cerveau. Les observations de Cajal lui ont permis d'affirmer, et ce dès 1888, que les neurones ne sont pas des éléments liés en continuité, mais bien des unités distinctes et liées entre elles de façon contiguë et possédant des points de contacts péricellulaires (Cajal, 1894). Quelques années plus tard, soit en 1897, Charles Scott Sherrington (1857-1952) a introduit le terme synapse pour désigner ce qu'on appelait alors des « articulations » cellulaires. Le terme synapse sera accepté de façon définitive au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, acceptation consécutive à leur observation en microscopie électronique (Palade et Palay, 1954). Toutefois, au moment

où Sherrington propose ce terme, on ignore encore tout des moyens employés par les neurones pour communiquer entre eux et avec les cellules environnantes. En 1904, Thomas R. Elliott formule la première hypothèse solide de la neurotransmission chimique. Ce sont ses travaux sur les effets sympathomimétiques de l'adrénaline qui l'amènèrent à proposer cette hypothèse (Elliott, 1904). Cependant, les premières preuves expérimentales concluantes en faveur de l'hypothèse de la neurotransmission chimique furent obtenues 20 ans plus tard par Otto Loewi (1873-1961). Par son travail sur des cœurs isolés de grenouilles et de crapauds, Loewi démontra que la stimulation du nerf cardiaque entraîne la libération de diverses substances dans le liquide de perfusion et il observa que le contact de ce liquide avec le cœur, provoquait les mêmes effets qu'une stimulation du nerf cardiaque (Loewi, 1921; Loewi, 1922). Finalement, il démontre que les effets du perfusat sont dus à une action de la substance cardiaque libérée. L'action de cette substance est liée uniquement à sa concentration. De plus, elle est localisée sur l'organe effecteur, le cœur, et non sur les terminaisons nerveuses qui ont libéré cette substance (Loewi et Navratil, 1924). De là est né le concept de neurotransmetteur (NT). Il ne restait dès lors qu'à déterminer leur nature chimique, ce qui fut établi assez rapidement. L'acétylcholine, identifié par Loewi et Navratil en 1926 (Loewi et Navratil, 1926a.1926b), fut le premier NT à être chimiquement caractérisé. La liste des neurotransmetteurs s'allongea, avec l'ajout, dans les années 60, du glutamate (Takeuchi et Takeuchi, 1963) et l'on compte maintenant au-delà d'une quinzaine de neurotransmetteurs potentiels dans le système nerveux, le glutamate étant maintenant reconnu comme le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux chez les vertébrés (Mayer et Westbrook, 1987b).

Par ailleurs, le développement des sciences biologiques à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle amena les scientifiques de cette époque à développer le concept de récepteur. C'est Paul Erlich (1845-1915) qui proposa ce terme en 1901. Le terme récepteur aidait Erlich à expliquer les interactions qu'il observait entre les antigènes et les anticorps de même qu'entre certains dérivés organiques de synthèse et quelques micro-organismes. Selon lui, l'action pharmacologique de certains composés est possible seulement s'ils se lient aux récepteurs qu'ils croient situés à la périphérie des cellules. C'est ce qu'on appelle

maintenant le concept de la clé et de la serrure. En 1906, Langley vient appuyer, et ce de façon importante, la théorie de la neurotransmission chimique en suggérant le terme de substance réceptive pour expliquer les effets de la nicotine et du curare sur la contraction musculaire (Langley, 1906). L'explosion chimiothérapeutique des années 30, de même que les nombreuses études des années 40 portant sur les effets des agonistes et des antagonistes, permirent à la notion de récepteur de devenir progressivement une théorie constituant les bases de la pharmacologie moléculaire actuelle. Toutefois, ce n'est qu'au début des années 70 que le récepteur est devenu une entité chimique isolée, avec comme conséquence le développement de la neurobiologie et de la neurobiophysique moléculaire. Cette percée scientifique est attribuée à Jean-Pierre Changeux et son équipe qui ont extrait et isolé le récepteur de l'acétylcholine à partir de l'organe électrique de raie *Torpedo* (Changeux et coll., 1970). À cette époque, les récepteurs au glutamate n'étaient pas très bien connus et caractérisés. Au cours de la décennie 1970, l'équipe de Jeffrey Watkins a développé des agonistes sélectifs des récepteurs au glutamate grâce auxquels ils réussirent à caractériser les différentes sous-unités de ce type de récepteur (en revue par Watkins et coll., 1990). Puis, en 1989, Stephen Heinemann et son équipe isolèrent les premiers récepteurs au glutamate, en exprimant, dans les oocytes de l'amphibien *Xenopus*, le produit protéique d'ADN complémentaire cloné (Hollmann et coll., 1989). Cette découverte permit par la suite la caractérisation moléculaire des récepteurs au glutamate ainsi qu'une meilleure compréhension de la physiologie des synapses glutamatergiques.

De nos jours, il est reconnu que le système glutamatergique est impliqué dans plusieurs phénomènes et fonctions cérébrales comme par exemple l'apprentissage et la mémoire. Le système glutamatergique est aussi impliqué dans la physiopathologie de diverses affections neurologiques aiguës et chroniques. Dans cette introduction, nous ferons un rapide survol de ces aspects pathologiques, mais d'abord nous réviserons les caractéristiques moléculaires des récepteurs au glutamate, pour ensuite discuter de leurs interactions avec différentes protéines cellulaires, de leur distribution cellulaire, ainsi que de la régulation de cette distribution.

## 1.2 ASPECTS MOLÉCULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE

On peut regrouper les récepteurs de la neurotransmission en deux catégories : les récepteurs ionotropes et les récepteurs métabotropes. Les récepteurs ionotropes sont constitués d'un assemblage de sous-unités protéiques qui forment un canal ionique transmembranaire. Ce canal ionique est sélectif au passage de certains ions et cette sélectivité est différente selon le type de récepteur. Quant à la perméabilité du récepteur ionique, elle dépend à la fois de la structure et du niveau d'activation du canal ionique. Pour leur part, les récepteurs métabotropes sont formés par un seul polypeptide, lequel est couplé à une protéine G. La fixation du neurotransmetteur sur le récepteur conduit à l'activation de la protéine G. Cette dernière active à son tour soit des canaux ioniques, soit des enzymes capables de générer des seconds messagers. Les récepteurs au glutamate de type ionotrope sont divisés en 3 catégories: les récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate), les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et les récepteurs kaïnate (Dingledine et coll., 1999; Watkins et coll., 1990) (**Tableau 1**). Les études de clonage ont permis de constater qu'il y avait une plus grande diversité des récepteurs au glutamate que celle observée initialement par les pharmacologistes et les électrophysiologistes. À ce jour, on a dénombré, chez les mammifères, 17 sous-unités de récepteurs glutamatergiques ionotropes dont 4 sous-unités pour les récepteurs AMPA (GluR1-GluR4), 5 sous-unités pour les récepteurs kaïnate (GluR5-GluR7, KA1 et KA2), 6 sous-unités pour les récepteurs NMDA (NR1, NR2A-NR2D et NR3A) et 2 sous-unités orphelines ( $\delta$ 1 et  $\delta$ 2). Quant aux récepteurs au glutamate métabotropes (RGLUm), 8 types différents furent répertoriés (Dingledine et coll., 1999; Shoepf et coll., 1999; Ozawa et coll., 1998; Conn et Pin, 1997) (**Tableau 2**).

Les sous-unités des différents récepteurs au glutamate ionotropes ont toutes une structure similaire. Elles possèdent un large domaine N-terminal de même que 4 segments membranaires hydrophobes (M1-M4). Selon Hollmann et son équipe (Hollmann et coll., 1994), le domaine N-terminal est extracellulaire, le domaine C-terminal est intracellulaire et tous les segments sont transmembranaires à l'exception du

	NMDA	AMPA	Kaïnate	Métabotropes
<b>AGONISTES</b>	Glu, asp, NMDA, Ibo	AMPA, FWD, quis, glu, kaïnate	Domoate, kaï, quis AMPA, FWD, glu	Quis, glu, ibo, t-ACPD,
<b>ANTAGONIS- TES</b>	AP7, AP5 (ou APV), CPP	GYK153655, CNQX=DNQX	DZKA, CNQX=DNQX	L-AP3, L-AP4, MCPG
<b>Bloqueurs du canal</b>	TCP, MK-801, Mg <sup>2+</sup> , kétamine	Barbiturates, Philanthotoxine	-----	-----
<b>Localisation</b>	Localisation pré- et postsynaptique;  Cortex +++ Hippocampe +++ Cervelet ++ Thalamus +	Localisation pré- et postsynaptique; majorité post.; présents sur les cellules gliales;  Cortex ++ Hippocampe +++ Cervelet ++ Thalamus +	Localisation pré- et postsynaptique; majorité pré;  Cortex ++ Hippocampe +++ Cervelet ++ Thalamus +	Localisation pré- et postsynaptique  Cortex ++ Hippocampe +++ Cervelet ++ Thalamus +
<b>Effets membranaires</b>	Dépolarisation Excitatrice lente	Dépolarisation Excitatrice rapide	Dépolarisation Excitatrice rapide	Dépolarisation Excitatrice lente
<b>Couplage</b>	Canal calcium, sodium et potassium	Canal sodium et potassium	Canal sodium et potassium	PLC ⇒ IP <sub>3</sub> +DG
<b>Composantes moléculaires (sous-unités du récepteur)</b>	NR1 NR2A-D	GluR1-4 (A-D) Versions flip et flop	GluR5-7 Ka1 et Ka2	MGluR1α-β MGluR2-6

**TABEAU 1.** Principales propriétés pharmacologiques et physiologiques des récepteurs au glutamate



segment M2. Ce modèle semblerait également s'appliquer aux récepteurs NMDA et kaïnate (Laube et coll., 1997; Bennett et Dingledine, 1995; Wo et Oswald, 1994, 1995; Wood et coll., 1995). De plus, ce serait les domaines transmembranaires qui permettraient l'assemblage des sous-unités de certains récepteurs (Stern-Bach et coll., 1994). L'arrangement de 4 ou 5 sous-unités (tétramère ou pentamère) identiques ou différentes (homodimérique ou hétérodimérique) permettrait la formation de récepteurs fonctionnels possédant un ou plusieurs sites pour les agonistes, les co-agonistes et les antagonistes (Dingledine et coll., 1999). Tous les récepteurs au glutamate lient le neurotransmetteur endogène L-glutamate, relâché par la terminaison présynaptique. Toutefois, le mode d'activation, la composition moléculaire, les actions sur les mécanismes cellulaires et l'affinité pour différents ligands exogènes sont des caractéristiques qui diffèrent selon le type de récepteur.

Groupe	Famille de récepteur	Sous-unité	Gène
1	AMPA	GluR1	<i>GRIA1</i>
1	AMPA	GluR2	<i>GRIA2</i>
1	AMPA	GluR3	<i>GRIA3</i>
1	AMPA	GluR4	<i>GRIA4</i>
2	KA	GluR5	<i>GRIK1</i>
2	KA	GluR6	<i>GRIK2</i>
2	KA	GluR7	<i>GRIK3</i>
3	KA	KA1	<i>GRIK4</i>
3	KA	KA2	<i>GRIK5</i>
4	NMDA	NR1	<i>GRIN1</i>
5	NMDA	NR2A	<i>GRIN2A</i>
5	NMDA	NR2B	<i>GRIN2B</i>
5	NMDA	NR2C	<i>GRIN2C</i>
5	NMDA	NR2D	<i>GRIN2D</i>
6	NMDA	NR3A	<i>GRIN3A</i>
7	orphelin	$\delta 1$	<i>GRID1</i>
7	orphelin	$\delta 2$	<i>GRID2</i>

Tiré de Dingledine et coll., 1999.

**TABLEAU 2.** Les différentes sous-unités des récepteurs au glutamate de type ionotrope.

### 1.2.1 Les récepteurs métabotropes du glutamate

Le récepteur métabotrope, sensible à l'action du glutamate et de l'acide quisqualique, se distingue des récepteurs canaux (ou récepteurs ionotropes) par sa capacité à produire une cascade biochimique complexe. En effet, la stimulation du récepteur métabotrope, par son agoniste, entraîne l'activation d'une phospholipase C (PLC), une enzyme couplée à un système membranaire de protéine G (Sladeczek et coll., 1998). L'activation de cette PLC conduit à une hydrolyse du phosphoinositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) membranaire, une substance permettant la formation immédiate de deux métabolites intracellulaires, l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG) (Berridge, 1984). Par ailleurs, divers travaux ont démontré que le DAG, formé par l'intermédiaire du récepteur métabotrope, induit la stimulation d'une protéine kinase C (PKC). La PKC est une enzyme qui joue un rôle important dans la mise en place de la LTP (du terme anglais **Long-Term Potentiation**) en permettant une phosphorylation de diverses protéines postsynaptiques dont le récepteur AMPA (Branham et coll., 1994; Farooqui et coll., 1988; Akers et coll., 1986). La LTP est le modèle expérimental de plasticité neuronale qui semble susceptible d'assurer les bases physiologiques du stockage de l'information (Morris et Frey, 1997; Davies et coll., 1992; Massicotte et coll., 1991; Staubli et coll., 1990). Dans ce modèle, l'application d'une stimulation électrique de haute fréquence dans l'hippocampe permet d'augmenter, et ce de façon durable, l'efficacité des synapses à véhiculer l'information entre les neurones. La LTP c'est donc cette augmentation durable de l'efficacité des synapses. L'IP<sub>3</sub>, métabolite dont il a été question précédemment, lorsque libéré par la membrane neuronale, assurerait une mobilisation cytosolique du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique lisse (Berridge, 1984). Cet effet intracellulaire de l'IP<sub>3</sub> permettrait d'assurer une relâche prolongée de calcium dans l'élément postsynaptique. Cette relâche prolongée contribuerait ainsi à augmenter la durée de l'action des enzymes tributaires du calcium responsables de modifier les propriétés fonctionnelles des récepteurs AMPA. Toutefois, l'IP<sub>3</sub> est une molécule qui peut être phosphorylée produisant ainsi divers métabolites qui semblent assurer des fonctions neuronales bien

particulières (Fukuda et Mikoshiba, 1995; Sasakawa et coll., 1995; Hughes et Michell, 1993), nous y reviendrons.

### **1.2.2 Les récepteurs ionotropes kaïnate**

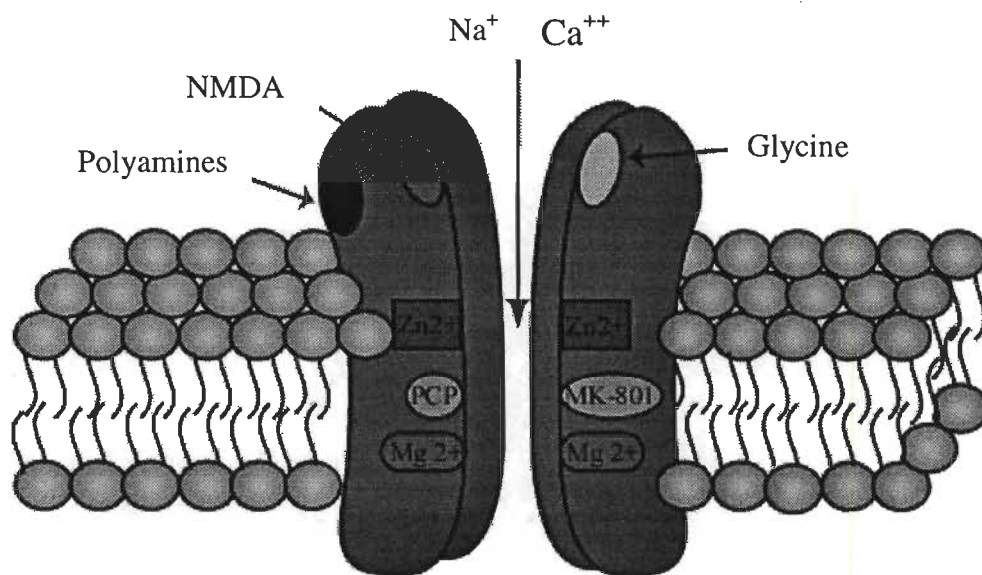
Dans le passé, l'absence d'agonistes et d'antagonistes spécifiques pour ce type de récepteur au glutamate a rendu difficile la mise en évidence de récepteurs kaïnate possédant des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles distinctes de celles des récepteurs AMPA. C'est la raison pour laquelle, dans la littérature scientifique, on présente les récepteurs ionotropes non-NMDA en utilisant souvent le terme récepteur AMPA/kaïnate. Néanmoins, certains récepteurs sensibles au kaïnate possèdent des particularités qui permettent de les distinguer des autres récepteurs glutamatergiques (Lerma et coll., 1997; Vignes et Collingridge, 1997). En effet, une faible proportion des récepteurs kaïnate possèdent une haute affinité pour le  $^3\text{H}$ -kaïnate et sont particulièrement sensibles à l'action de l'acide domoïque, une toxine retrouvée dans certains crustacés. Ces sites sont retrouvés en forte concentration dans les fibres moussues de l'hippocampe et sont majoritairement localisés sur la portion présynaptique des neurones glutamatergiques. D'un point de vue physiologique, l'activation accrue de ces récepteurs présynaptiques favoriserait une relâche exorbitante de glutamate, ce qui causerait, notamment, des dommages neuronaux irréversibles dans la région CA<sub>3</sub> de l'hippocampe (Ben-Ari et coll., 1988).

### **1.2.3 Les récepteurs ionotropes de type NMDA**

Le récepteur NMDA fut nommé ainsi en raison de sa grande sensibilité pour le N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ce récepteur au glutamate est composé de quatre sous-unités transmembranaires qui sont regroupées pour permettre la formation d'un canal perméable à certains ions. Le récepteur NMDA possède également de nombreux sites de liaison pour différents agonistes et antagonistes pharmacologiques. On peut en effet retrouver un site activateur spécifique au NMDA et au neuromédiateur endogène glutamate (Cotman et coll., 1989), un site potentialisateur pour la glycine (Musleh et

coll., 1997; Johnson et Ascher, 1987), un site pour les polyamines (Williams et coll., 1989) et finalement un site inhibiteur pour le zinc (Mayer et Westbrook, 1987a). De plus, l'intérieur du canal NMDA contient divers sites de liaison pour diverses molécules comme par exemple le MK-801 (5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maléate) et le PCP (phencyclidine) (Dingledine et coll., 1999) (**Fig. 1**).

À l'échelle fonctionnelle, le récepteur NMDA est normalement bloqué de manière voltage-dépendant par l'ion magnésium (Mayer et coll., 1984; Nowak et coll., 1984). Puisque ce blocage par le magnésium est quasi permanent, le récepteur NMDA n'intervient habituellement pas dans la transmission synaptique de base assurée par le glutamate.



**FIGURE 1.** Schéma du récepteur NMDA et de ses différents sites de liaisons pharmacologiques.

L'ouverture du canal NMDA ne se fait donc qu'à certaines conditions. Premièrement, il doit y avoir liaison du glutamate et de son co-agoniste la glycine à leur site de liaison respectif, la liaison de la glycine étant essentielle pour assurer une ouverture efficace

du canal. Deuxièmement, la dépolarisation membranaire doit être suffisante pour lever le blocage par l'ion magnésium. Cette dépolarisation membranaire est normalement fournie par l'activation préalable des récepteurs AMPA. Outre l'entrée de sodium et la sortie de potassium à travers le canal NMDA, l'activation de ce récepteur favorisera l'entrée d'une importante quantité de calcium dans l'élément postsynaptique (Murphy et Miller, 1988). Or, il est reconnu que cette caractéristique unique du canal NMDA à faire pénétrer le calcium à l'intérieur du neurone constitue l'élément essentiel de la plasticité synaptique, phénomène qui pourrait expliquer certains processus complexes comme l'apprentissage et la mémoire (Coomber, 1997; Aztély et Gustafsson, 1996; Maren et Baudry, 1995; Bear et Malenka, 1994; Artola et Singer, 1993; Malenka et Nicoll, 1993; Massicotte et Baudry, 1990).

D'un point de vue moléculaire, le récepteur NMDA est constitué de trois types de sous-unités protéiques nommées NR1, NR2A-D et NR3A (Dingledine et coll., 1999; Monyer et coll., 1992; Moriyoshi et coll., 1991). Chacune de ces sous-unités possède des caractéristiques physiologiques et pharmacologiques qui lui sont propres (Seeburg, 1993). De plus, il a été démontré qu'un assemblage différentiel des diverses sous-unités qui composent le récepteur NMDA permet de moduler son activité. (Wisden et Seeburg, 1993; Nakanishi et coll., 1992). Par exemple, la sous-unité NR2 procure au récepteur NMDA une perméabilité accrue pour le calcium favorisant ainsi une accumulation plus importante de l'ion calcium dans l'élément postsynaptique. La sous-unité NR3A, quant à elle, servirait à la régulation du récepteur NMDA et plus particulièrement à modérer le flux calcique qui le traverse (Das et coll., 1998).

En plus de son implication dans les processus de mémorisation et d'apprentissage, le récepteur NMDA aurait également un rôle à jouer dans le développement du système nerveux où il établirait les connexions synaptiques et éliminerait les neurones surnuméraires (McDonald et Johnston, 1990; Cotman et coll., 1989). En ce sens, certaines études ont montré qu'en injectant de l'AP-5, un antagoniste du récepteur NMDA, la croissance normale des cellules neuronales en culture est inhibée (Davies et coll., 1992). De plus, il semblerait qu'une activation excessive des

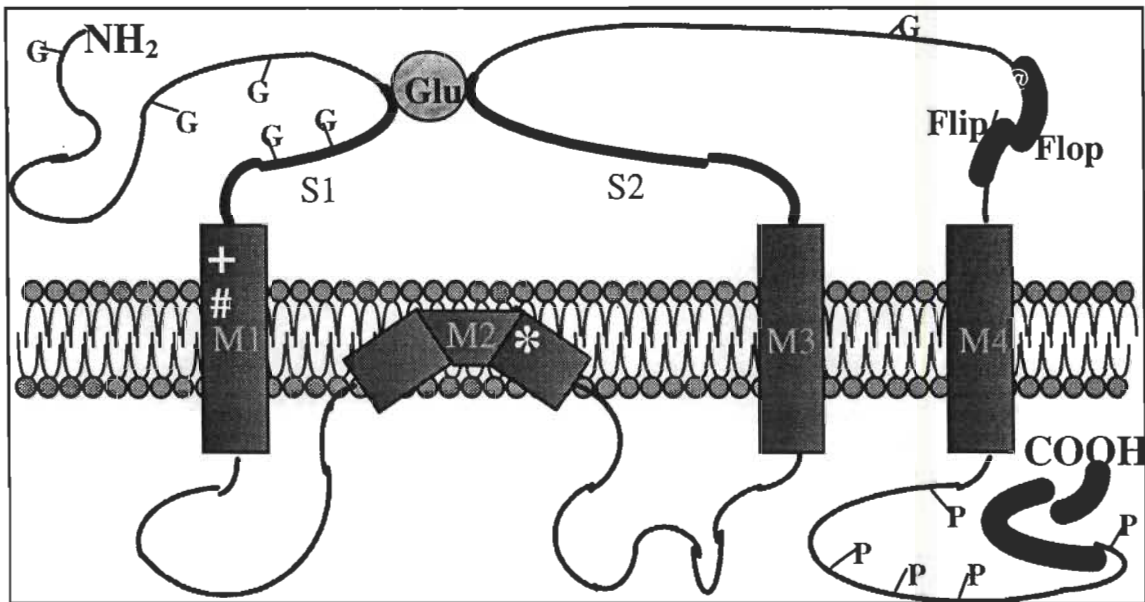
récepteurs NMDA soit responsable des dommages cérébraux présents dans diverses pathologies comme l'ischémie, l'hypoglycémie, l'épilepsie et de façon plus spéculative, dans certaines pathologies neurodégénératives, comme par exemple la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la chorée d'Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Doble, 1995; Farooqui et Horrocks, 1991; Cotman et coll., 1989; Olney 1989). D'un point de vue pharmacologique, le D-AP5, un antagoniste du récepteur NMDA, possède des propriétés neuroprotectrices et anticonvulsives (en revue par Choi, 1998; Dingledine et coll., 1990). Fait intéressant, certains chercheurs ont mis au point un vaccin contre la sous-unité NR1 du récepteur NMDA. Ce vaccin, administré oralement, préviendrait efficacement la neurodégénération et les épisodes épileptiques chez des modèles de rats ischémiques et épileptiques (During et coll., 2000).

#### **1.2.4 Les récepteurs ionotropes de type AMPA**

Le récepteur AMPA se caractérise par sa reconnaissance préférentielle de l'agoniste  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA). La stimulation, via son agoniste, de ce type de récepteur glutamatergique, entraîne une entrée importante de sodium dans la cellule. Cette entrée de sodium s'accompagne d'une sortie équivalente d'ions potassium vers l'extérieur de la cellule (en revue par Dingledine et coll., 1999; Ozawa et coll., 1998). Au cours des dernières années, de nombreuses études ont tenté de caractériser les rôles physiologiques des récepteurs AMPA (Monaghan et coll., 1989). En utilisant des agonistes et antagonistes pharmacologiques spécifiques, on a pu démontrer que les récepteurs AMPA assurent probablement la majeure partie des effets excitateurs du glutamate (Mayer et Westbrook, 1987b). Les agonistes pharmacologiques du récepteur AMPA sont, principalement, l'AMPA, le quisqualate, le kaïnate et le (S)-5-fluorowillardiine (FWD) (Hawkins et coll., 1995). Les composés dérivés de la quinoxaline (CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione et DNQX: 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) sont, par ailleurs, des antagonistes compétitifs particulièrement efficaces pour réduire l'activation des récepteurs de type AMPA.

Concernant les caractéristiques moléculaires des récepteurs AMPA, diverses études ont révélé l'existence d'au moins quatre ARNm codant pour les différentes sous-unités du récepteur AMPA. Le complexe récepteur de type AMPA résulterait de l'agencement différentiel de quatre sous-unités protéiques appelées GluR1-4 (Seeburg, 1993). Ces quatre sous-unités ont d'ailleurs été clonées au début des années 1990 (Boulter et coll., 1990; Keinänen et coll., 1990; Nakanishi et coll., 1990).

Selon une étude (Hollmann et coll., 1994) effectuée sur la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA, ce dernier serait composé d'un large domaine N-terminal extracellulaire, d'un domaine C-terminal extracellulaire et de quatre segments transmembranaires hydrophobes (M1-M4) (**Fig. 2**). Rappelons que ce modèle s'appliquerait aussi aux autres récepteurs glutamatergiques ionotropes que sont les récepteurs NMDA et kaïnate (Laube et coll., 1997; Bennett et Dingledine, 1995; Wo et Oswald, 1995, 1994; Wood et coll., 1995). Ce serait également ces domaines transmembranaires qui régiraient l'assemblage des différentes sous-unités du récepteur AMPA (Stern-Bach et coll., 1994). Ainsi, un groupement de 4 ou 5 sous-unités (tétramère ou pentamère) identiques ou différentes (groupements homo- ou hétéromériques) permettrait de former des récepteurs fonctionnels possédant un ou plusieurs sites de liaison pour les agonistes, les co-agonistes et les antagonistes (Dingledine et coll., 1999; Ziff, 1999). Ces sites de liaison, présents sur chacune des sous-unités des RGLU ionotropes, sont des pochettes d'acides aminés formées par deux segments, S1 et S2 (**Fig. 2**), le premier étant situé en N-terminal de M1 et le second, entre M3 et M4 (Stern-Bach et coll., 1994; Uchino et coll., 1992; en revue par Dingledine et coll., 1999; Ozawa et coll., 1998; Ziff, 1999). Bref, tous ces récepteurs lient le neurotransmetteur endogène L-glutamate qui est relâché par l'élément présynaptique, mais leur mode d'activation, leur composition moléculaire, leurs actions sur les mécanismes cellulaires et leurs affinités pour une variété de ligands exogènes diffèrent.



**FIGURE 2.** Structure du récepteur AMPA et des récepteurs au glutamate de type ionotrope.

De plus, il a été démontré que l'épissage alternatif des ARNm codant pour chacune des sous-unités du récepteur AMPA engendre la production de deux versions distinctes de celles-ci nommées flip et flop (Sommer et coll., 1990) (**Fig. 3**). Fait intéressant, la version flip du récepteur est normalement associée à la production d'une transmission neuronale beaucoup plus importante que celle générée par la version flop. Il a par ailleurs été démontré que les ARNm des différentes sous-unités du récepteur AMPA sont sujets à une régulation de leur expression au cours de la période postnatale. À titre d'exemple, les sous-unités flip, prédominantes dans le cerveau embryonnaire, sont progressivement remplacées par les sous-unités flop quelques jours après la naissance (Standley et coll., 1995). Cependant, certaines populations de neurones matures ne continueront d'exprimer que la forme flop. C'est le cas des cellules pyramidales de la région CA<sub>3</sub> de l'hippocampe (Monyer et coll., 1991).



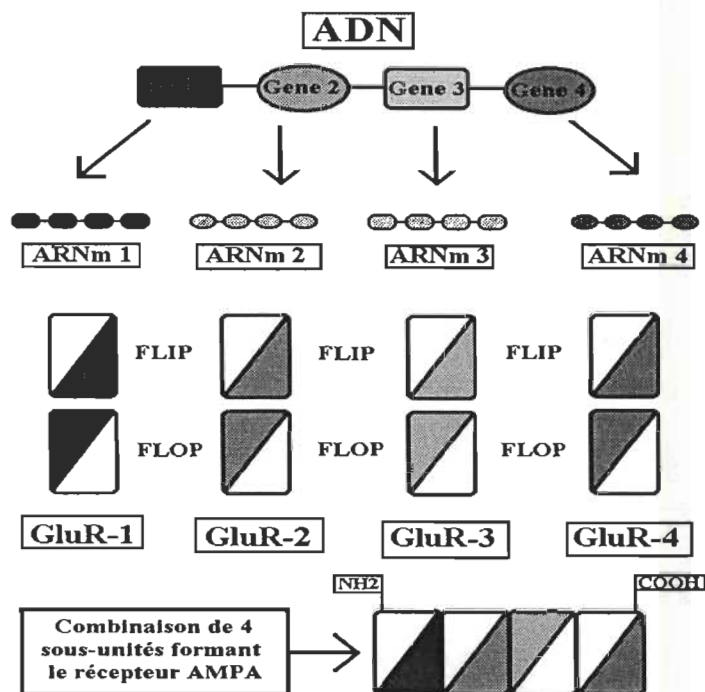
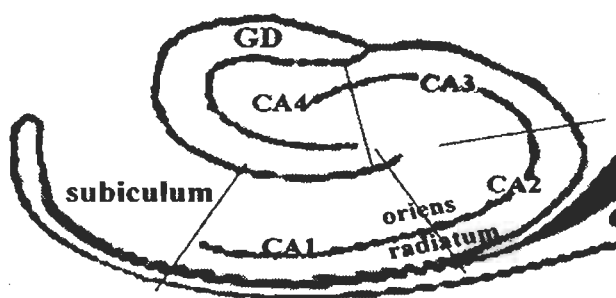


FIGURE 3. Arrangement moléculaire du récepteur AMPA.

Malgré le fait que les récepteurs AMPA soient distribués de façon ubiquitaire dans le SNC, on peut observer des différences régionales de densité. Des études de liaison effectuées avec de l'AMPA tritié, ( $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ ) sur des coupes de rats (Chabot et coll., 1997; Foster et coll., 1996; Gagné et coll., 1996, 1997, 1998; Insel et coll., 1990; Monaghan et coll., 1984; Olsen et coll., 1987), ont démontré que l'hippocampe est une structure qui possède une densité de liaison intense. Cette densité de liaison est légèrement plus élevée dans la région  $\text{CA}_1$  que dans la région  $\text{CA}_3$ , et dans la couche de cellules pyramidales que dans les *stratum oriens* et *radiatum* (Fig. 4). On peut également retrouver une densité élevée de récepteurs AMPA dans la couche moléculaire du *gyrus dentatus*. Des régions comme le cortex, le striatum et la couche moléculaire du cervelet ont des densités de récepteurs intermédiaires. C'est par ailleurs dans le thalamus, le tronc cérébral et la couche granulaire du cervelet qu'on retrouve les plus

faibles densités. Des études d'hybridation *in situ* ont révélé que les différentes sous-unités du récepteur AMPA ont également une distribution régionale différentielle dans le cerveau des mammifères matures (Bahn et Wisden, 1996; Monyer et coll., 1991; Sommer et coll., 1990). Cette distribution différentielle serait toutefois due à une variation du niveau d'expression des différentes sous-unités, puisque les 4 sous-unités se retrouvent coexprimées dans la majorité des régions cérébrales.



**FIGURE 4.** Les différentes régions et les principales voies excitatrices de l'hippocampe. Les régions visibles comprennent la Corne d'Ammon (CA) et le gyrus dentatus (GD).

#### 1.2.4.1 Régulation des récepteurs AMPA

Tel que mentionné auparavant, les récepteurs AMPA assurent la neurotransmission excitatrice de base dans la plupart des synapses du système nerveux central (SNC). Or, afin qu'ils puissent remplir leur rôle physiologique de façon efficace, l'activité des récepteurs AMPA doit être modifiable.

Il semble que la composition différentielle des récepteurs AMPA soit un facteur de régulation de l'activité du canal récepteur AMPA. À cet égard, des études électrophysiologiques ont montré que certains récepteurs possédaient une perméabilité

accrue au calcium et autres cations divalents (Iino et coll., 1990). Ce résultat expérimental peut s'avérer surprenant considérant que normalement la perméabilité des récepteurs AMPA au calcium est faible. Toutefois, cette augmentation de la perméabilité au calcium a été observée uniquement chez les récepteurs AMPA ne possédant pas la sous-unité GluR2 (en revue par Dingledine et coll., 1999; Ozawa et coll., 1998). Le contrôle de la perméabilité calcique des récepteurs AMPA, associée à la sous-unité GluR2, est attribuable à un seul résidu d'acide aminé situé dans le segment M2 (Burnashev et coll., 1992; Hume et coll., 1991; Mishina et coll., 1991). À cet égard, il fut démontré que les neurones glutamatergiques ne possédant pas la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA, laissent pénétrer davantage de calcium lors d'une ischémie provoquée (Bennett et coll., 1996).

Il a également été démontré que l'ARNm des différentes sous-unités du récepteur AMPA est sujet à une régulation de son expression au cours de la période postnatale (Standley et coll., 1995; Pelligrini-Giampietro et coll., 1991). Compte tenu du fait qu'il est très difficile de reproduire le phénomène de la LTP chez le jeune animal (Chabot et coll., 1996; Muller et coll., 1989), il fut proposé que ce déficit d'ordre électrophysiologique résulte fort probablement d'un arrangement particulier des sous-unités (GluR1-4 flip ou flop) qui composent les récepteurs membranaires de type AMPA durant la période du développement (Wisden et Seeburg, 1993; Nakanishi, 1992). D'autres études tendent à démontrer l'importance physiopathologique de la régulation des récepteurs AMPA. En effet, certains modèles expérimentaux, présentant des désordres électrophysiologiques glutamatergiques similaires à ceux observés chez les jeunes animaux, furent aussi étudiés. À titre d'exemple, les rats atteints de diabète mellitus et les souris déficientes en APOE présentent des troubles électrophysiologiques en laboratoire ainsi qu'une perte de capacité à moduler le récepteur AMPA (Krzywkowski et coll., 1999; Gagné et coll., 1997). Dans le cas du diabète mellitus, il est proposé qu'une diminution quantitative de la sous-unité GluR1 provoquerait une incapacité à réguler adéquatement les récepteurs AMPA. Dans l'ensemble, la modulation des caractéristiques moléculaires des récepteurs AMPA s'avère donc déterminante pour contrôler efficacement la fonction des synapses glutamatergiques.

#### 1.2.4.2 Distribution cellulaire des récepteurs AMPA

Au niveau cellulaire, les études immunohistochimiques ont démontré que les quatre sous-unités du récepteurs AMPA étaient retrouvées dans le cytoplasme, au niveau de la membrane plasmique, du corps cellulaire et des dendrites (Petrálie et Wenthold, 1992). Ainsi, il y aurait deux populations de récepteurs AMPA entraînant la formation d'une certaine compartimentation cellulaire de ces récepteurs: une population microsomale ou cytoplasmique et une population synaptosomale ou membranaire. Le marquage des sous-unités dans le cytoplasme s'est révélé être éparé et serait le résultat du transport des récepteurs qui proviennent de la membrane ou qui se dirigent vers celle-ci. Quant aux récepteurs membranaires, ils sont principalement situés au niveau des densités postsynaptiques. Suite à cette étude Henley effectua le fractionnement cellulaire des récepteurs AMPA en 1995 et isola donc, par ultracentrifugation, les populations microsomales et synaptosomales des récepteurs AMPA (Henley, 1995). En 1996, Richmond et coll. ont observé qu'il y avait une différence de marquage immunologique entre les populations membranaires et totales pour la sous-unité GluR1 (Richmond et coll., 1996). Suivant ces observations, ils conclurent qu'il y avait probablement une population intracellulaire de récepteurs AMPA et que ces derniers semblaient localisés dans le corps cellulaire et les dendrites proximaux. Cette localisation différentielle serait provoquée par l'existence de mécanismes cellulaires responsables du trafic des différentes sous-unités du récepteur AMPA de leur site de synthèse à leur site d'insertion dans la membrane neuronale. Par conséquent, les études immunohistochimiques et le fractionnement cellulaire laissent donc entrevoir la possibilité que les récepteurs AMPA puissent se déplacer et « voyager » entre les différents compartiments neuronaux et ainsi entraîner une régulation de la fonction synaptique des neurones glutamatergiques (pour une revue voir Turrigiano, 2000).

Les résultats expérimentaux obtenus par Henley sur la distribution différentielle des récepteurs AMPA appuient un autre mécanisme hypothétique de régulation des récepteurs AMPA dans la plasticité neuronale. En l'occurrence, pour subir un

changement dans le nombre de synapses fonctionnelles, il y aurait, dans ce phénomène de potentialisation synaptique, une conversion rapide de certaines synapses dites non fonctionnelles (synapses silencieuses) en synapses fonctionnelles (Malenka et Nicoll, 1997). Cette apparition de « nouvelles » synapses serait associée à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA et à une hausse durable de l'efficacité des neurones à transmettre l'information (Durand et coll., 1996; Isaac et coll., 1995; Liao et coll., 1995).

De plus, d'autres données récentes permettent de confirmer l'importance de la régulation à l'échelle des compartiments cellulaires sur la fonction de nombreux récepteurs. À titre d'exemple, les récepteurs de la tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G sont rapidement internalisés suivant l'activation par leur ligand respectif (Grady et coll., 1997; Viveira et coll., 1996; Hausdorff et coll., 1990). Concernant les récepteurs AMPA, il y aurait également une redistribution rapide, causant ainsi une augmentation du nombre de ces récepteurs au niveau de la membrane postsynaptique (Lissin et coll., 1999). Les principaux acteurs impliqués dans la distribution cellulaire des récepteurs AMPA commencent tout juste à être identifiés. Toutefois, il semble à ce jour que les mécanismes en cause puissent être semblables à ceux utilisés par diverses protéines sujettes à des processus classiques des recyclages notamment via l'exocytose et l'endocytose.

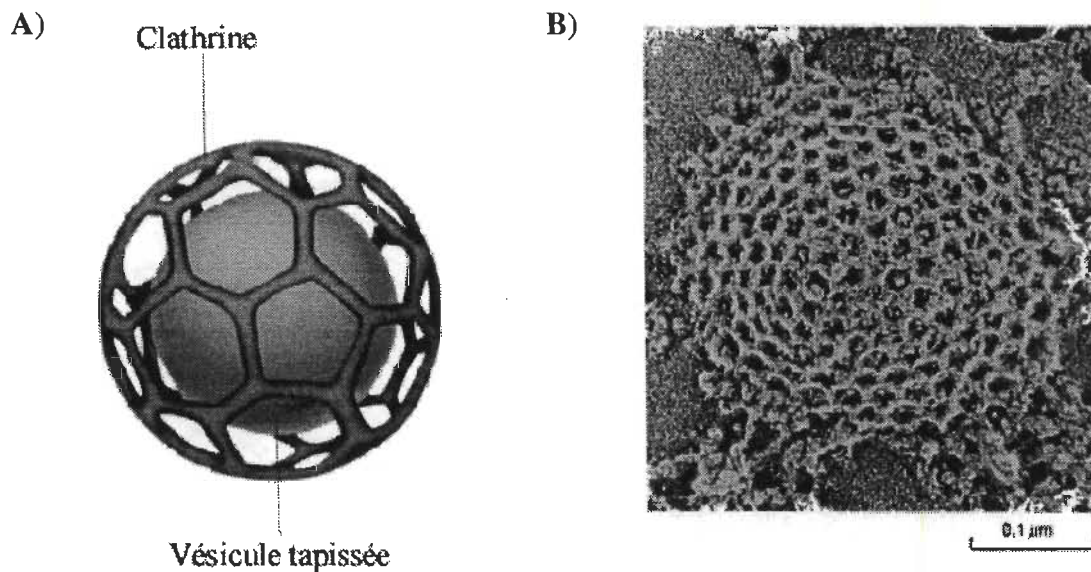
### **1.3 REVUE DES PROCESSUS DE RECYCLAGE MEMBRANAIRE**

Il est bien établi que les processus membranaires liés à l'endocytose et à l'exocytose de diverses protéines résidant à la surface des cellules sont essentiels au contrôle de multiples fonctions métaboliques et cellulaires. À titre d'exemple, l'élimination de la circulation sanguine des lipoprotéines de faible densité (LDL) s'effectue via un processus d'endocytose classique de cette molécule et de son récepteur membranaire. Dans le cas du récepteur aux LDL, et dans un objectif d'économie cellulaire, le récepteur qui s'est vu internalisé sera recyclé et retournera à la surface membranaire par un processus d'exocytose spécifique à la réinsertion des protéines membranaires. De plus, la destinée ultime d'une protéine à l'échelle cellulaire dépendra

essentiellement de l'équilibre des activités d'endocytose et d'exocytose. À titre d'exemple, une protéine pourra se voir préférentiellement localisée à l'intérieur d'une cellule si l'équilibre des activités de recyclage favorise l'endocytose.

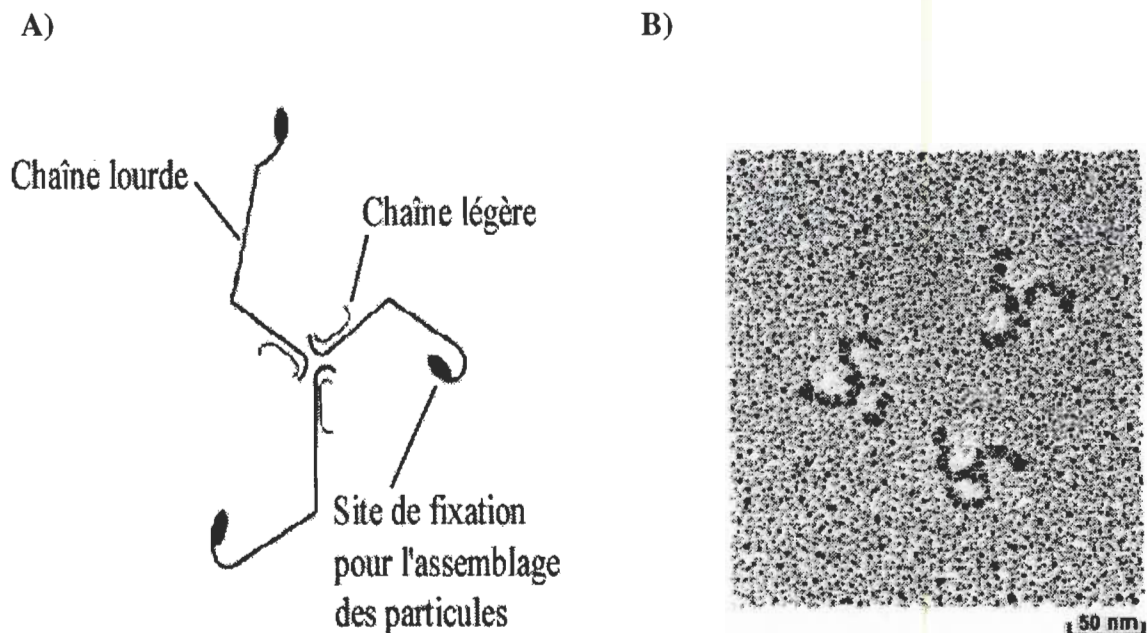
### 1.3.1 Endocytose des récepteurs

L'endocytose est un processus par lequel des molécules sont englobées par la membrane cytoplasmique et introduites dans la cellule suivant la formation d'une vésicule membranaire. Le phénomène d'endocytose le mieux défini est celui qui implique la participation de la clathrine. Au cours de cette forme d'endocytose, une dépression se forme au niveau de la membrane plasmique. Cette dépression, nommée puits, est tapissée de molécules protéiques et permet de faire pénétrer les récepteurs membranaires dans le cytoplasme des neurones. La principale protéine des puits, qu'on appelle aussi vésicules tapissées, est la clathrine (**Fig. 5**).



**FIGURE 5.** Vésicule tapissée de clathrine. A) Représentation schématique. B) Micrographie électronique.

Elle est composée d'une chaîne lourde de 180 KDa et de deux chaînes légères de 33 KDa et 36 KDa. L'unité de base de la clathrine est le triskélion, lui-même constitué d'un assemblage de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères (Kirchhausen et Harrison, 1981; Ungewickell et Branton, 1981). Ces triskélions s'assembleront et polymériseront pour former un réseau hexagonal ressemblant à une cage (**Fig. 6**). La formation progressive de la cage de clathrine entraînera un changement de morphologie au niveau de la membrane cellulaire pour former graduellement une vésicule d'endocytose. Une fois la vésicule intériorisée, la clathrine se détache de celle-ci, se dépolymérise et retourne à la surface cellulaire pour former de nouveaux puits tapissés.



**FIGURE 6.** Structure du triskélion, l'unité de base de la clathrine. **A)** Représentation schématique du triskélion **B)** Micrographies de triskélions purifiés.

Plusieurs protéines de la membrane plasmique sont internalisées par des mécanismes utilisant la clathrine. Outre les récepteurs pour les LDL (Wang et coll.,



1993; Lin et coll., 1991), mentionnons le récepteur de la transferrine (Bled & Bretscher, 1982), le récepteur de l'asialoglycoprotéine (Wall et coll., 1980), le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Gordon et coll., 1978; Haigler et coll., 1979), de même que la molécule cellulaire d'adhésion neuronale L1 (Neural Cell Adhesion Molecule L1) (Kamiguchi et coll., 1998). Il a même tout récemment été proposé que les récepteurs GABA étaient internalisés par des processus impliquant la clathrine et l'AP-2 (Kittler et coll., 2000).

Cependant, bien que la clathrine soit une protéine essentielle à l'internalisation des protéines et des récepteurs membranaires, elle n'agit pas seule. Des protéines appelées adaptines sont aussi responsables, avec la clathrine, du bon fonctionnement du processus d'endocytose (**Fig. 7**). Les adaptines sont des molécules qui permettront aux triskélions de s'assembler pour conduire à la formation d'une vésicule tapissée de clathrine (Beck et coll., 1992; Keen et coll., 1991; Lin et coll., 1991; Keen et Beck, 1989). On connaît principalement deux types d'adaptines, l'AP-1 et l'AP-2 qui se situent entre la cage de clathrine et la membrane cellulaire. La localisation des adaptines permet donc de faire le pont entre les récepteurs membranaires et la clathrine pour conduire à l'endocytose de ces récepteurs (Beck et coll., 1992; Keen, 1987; Unanue et coll., 1981; Vigers et coll., 1986; Pearse & Robinson, 1984). Concrètement, l'AP-1 est associée avec l'appareil de Golgi tandis que l'AP-2 est associée avec la membrane plasmique (Ahle et coll., 1988; Robinson, 1987). Par conséquent, c'est l'AP-2 qui sera impliquée dans l'endocytose des récepteurs membranaires. Tel que montré à la figure 8 (**Fig. 8**), l'AP-2 est constituée de plusieurs sous-unités ayant des rôles respectifs. Mentionnons la sous-unité  $\alpha$  (105 KD ou 115 KD), la sous-unité  $\beta$  (105 KD ou 115 KD), la sous-unité  $\mu$  (50 KD) et la sous-unité  $\sigma$  (17 KD).



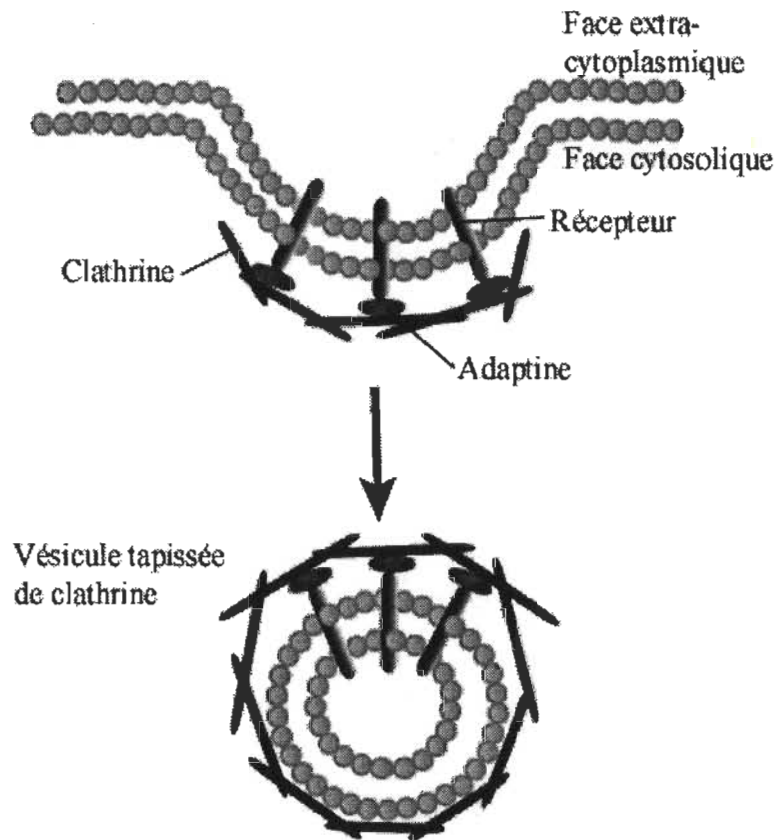


FIGURE 7. Endocytose médiée par la clathrine et l'adaptine.

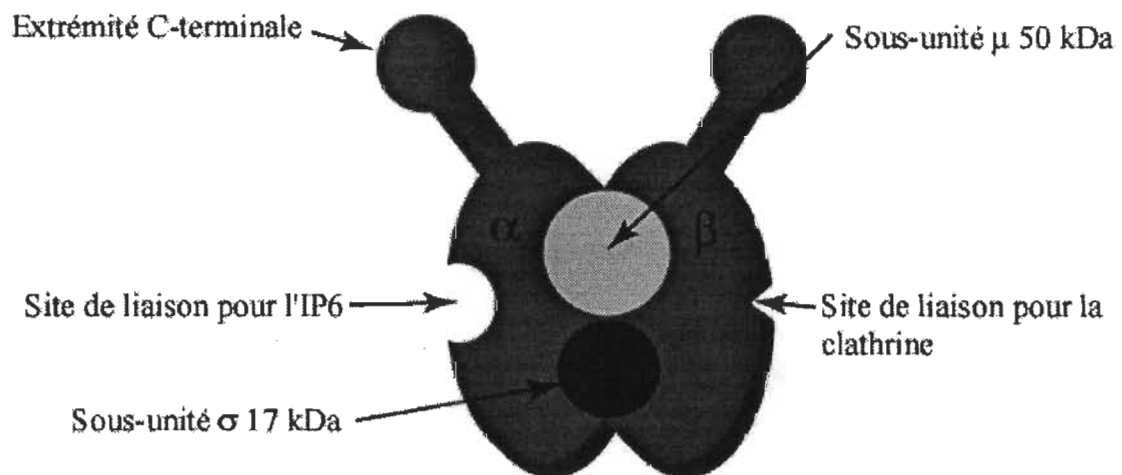


FIGURE 8. Représentation schématique de la structure de l'adaptine (AP)-2.

C'est la sous-unité  $\beta$  qui serait responsable de la liaison avec la clathrine puisque la majorité des sites de liaison pour la clathrine se retrouve sur cette sous-unité (Ahle et Ungewickell, 1989; Keen et Beck, 1989). Ces sites de liaison sont essentiels pour faire le lien entre la clathrine et une séquence signal de la molécule réceptrice. L'ancrage de l'AP-2 au niveau de la membrane plasmique contribuerait donc à faciliter l'assemblage de la clathrine et, conséquemment, induirait la formation d'une vésicule contenant les protéines ou les récepteurs devant être internalisés. Bien sûr la clathrine et l'adaptine ne sont pas les seuls acteurs impliqués dans l'endocytose des composantes membranaires et plusieurs autres protéines dites accessoires semblent contribuer de manière spécifique à la régulation de ce processus membranaire. Dans la portion subséquente de cette introduction, une attention toute particulière sera portée sur les protéines accessoires reconnues pour interagir avec les récepteurs au glutamate et susceptibles d'intervenir dans les processus de recyclage membranaire.

#### **1.4 PROTÉINES ACCESSOIRES DES RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE**

Nombre d'études biochimiques et immunohistochimiques ont démontré une distribution cellulaire caractéristique des récepteurs AMPA, et ce, en faveur d'une localisation majoritairement intracellulaire d'environ 70 %. Par conséquent, il a été proposé que cette distribution particulière des récepteurs AMPA puisse être le résultat d'une dynamique cellulaire favorisant l'endocytose de ces récepteurs, une hypothèse qui s'avère de plus en plus probable compte tenu des récentes observations démontrant l'interaction du récepteur AMPA avec certaines protéines accessoires ayant un rôle prédominant dans les processus endocytiques. La protéine GRIP (de l'anglais **G**lutamate **R**eceptor **I**nteracting **P**roteins) est une protéine de 130 KDa qui interagirait avec l'extrémité C-terminale des sous-unités GluR2 et GluR3 du récepteur AMPA (Dong et coll., 1997) afin de localiser les récepteurs AMPA au niveau de la membrane synaptique. La protéine GRIP contient sept régions bien particulières qu'on appelle domaines PDZ. Les domaines PDZ contiennent environ 80 à 90 résidus d'acides aminés

qui sont organisés de façon à former 5 ou 6 brins  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$ . Les domaines PDZ se lient aux 4 ou 5 résidus acides aminés situés à l'extrémité C-terminale de certaines protéines qui sont souvent des récepteurs membranaires ou des canaux ioniques. Bien qu'elle contienne sept domaines PDZ, seulement les quatrième et cinquième domaines, qui contiennent des protéines adaptatrices de la protéine GRIP, sont capables d'interactions avec les sous-unités GluR2 et GluR3. Les autres domaines PDZ n'interagissent pas avec le récepteur AMPA mais ils pourraient servir à l'ancrage du récepteur AMPA avec le cytosquelette ou avec d'autres protéines régulatrices. La protéine GRIP est spécifique au récepteur AMPA puisqu'aucune interaction n'a été identifiée avec le récepteur NMDA (Srivastava et coll., 1998). De récentes études démontrent que deux autres protéines synaptiques, Pick1 (Xia et coll., 1998) et ABP (de l'anglais **A**MPA **r**eceptor-**B**inding **P**rotein) (Srivastava et coll., 1998) interagissent avec les sous-unités GluR2 et GluR2/3. Tout comme la protéine GRIP, la protéine ABP ne présenterait aucune interaction avec le récepteur NMDA (Srivastava et coll., 1998) et serait impliquée dans la régulation et la localisation des récepteurs AMPA par sa liaison avec des protéines du cytosquelette ou avec des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire (Srivastava et Ziff, 1999).

Une autre protéine potentiellement impliquée dans la régulation de la distribution cellulaire des récepteurs AMPA est la protéine de fusion NSF qui interagit spécifiquement avec la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA. Cette protéine homohexamérique est une ATPase impliquée dans bon nombre d'événements de fusion membranaire comme par exemple le transport protéique au sein de l'appareil de Golgi et l'exocytose des vésicules synaptiques. Le site de liaison de la protéine NSF est différent du site de liaison des protéines GRIP et ABP et réside dans le domaine C-terminal de la sous-unité GluR2. Plus particulièrement, NSF interagirait avec 3 résidus, la lysine, la glycine et l'asparagine, situés respectivement aux positions 844, 853 et 851 et qui sont retrouvés exclusivement au sein de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA. Des études en immunohistochimie montrent que GluR2 et NSF coimmunoprécipitent et sont colocalisées au niveau des dendrites et du cône axonal (Osten et coll., 1998; Song et coll., 1998). De plus, d'autres études suggèrent que l'interaction NSF-GluR2 est

nécessaire à l'expression à la surface membranaire des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluR2 et que le bris de cette interaction provoque une perte de récepteurs AMPA au niveau de la synapse (Noel et coll., 1999).

La dynamine est une autre protéine fort probablement impliquée dans l'endocytose des récepteurs au glutamate. Au moment de sa découverte, on croyait que la dynamine n'était qu'une protéine de liaison des microtubules, un élément important du cytosquelette. Ce n'est que plus tard qu'on découvrit que la dynamine n'avait en fait aucune fonction physiologique liée aux microtubules, mais qu'elle était requise pour l'endocytose médiée par la clathrine. Il existe trois formes de dynamine, les dynamines 1, 2 et 3. Au niveau des synapses on retrouve plus particulièrement les dynamines 1 et 2. La dynamine neuronale 1 est phosphorylée par la protéine kinase C et déphosphorylée par la calcineurine durant le potentiel d'action au niveau de la terminaison nerveuse. Il est même possible que ce soit cette déphosphorylation qui amorce l'endocytose. D'un point de vue expérimental, il fut, premièrement, clairement démontré que la dynamine joue un rôle clé dans le recyclage des vésicules présynaptiques (Cremona et De Camilli, 1997; Poodry, 1990; Van der Blick et Meyerowitz, 1991). Par la suite, d'autres expériences réalisées à l'aide de culture de cellules hippocampales et de vecteurs adénoviraux non réplicatifs mutant pour la dynamine 2 ont permis de préciser un rôle potentiel de la dynamine dans la structure postsynaptique. Les cellules qui ont intégré l'adénovirus mutant pour la dynamine présentent une inhibition de l'internalisation des récepteurs AMPA. Par contre, les cellules contrôles qui ont intégré un adénovirus sauvage voient leurs récepteurs AMPA normalement internalisés (Carroll et coll., 1999a). Ces études suggèrent donc que l'endocytose est un moyen de réguler la composition biochimique des synapses glutamatergiques et que ce processus aurait un rôle à jouer dans la modulation de la transmission synaptique.

Il existe également ce qu'on appelle les protéines associées aux synapses (SAPs de l'anglais Synapse-Associated Proteins) dont une de ces protéines, la SAP97, est associée au récepteur AMPA. En effet, SAP97 se lierait à la sous-unité GluR1 du

récepteur AMPA sans toutefois interagir directement avec les sous-unités GluR2 et GluR3 de ce récepteur. L'interaction entre certaines protéines, dont la protéine SAP97, régulerait l'activité des récepteurs AMPA et serait probablement nécessaire à la conversion des synapses silencieuses en synapses fonctionnelles (Leonard et coll., 1998).

L'actine serait également importante dans la régulation moléculaire des récepteurs glutamatergiques et plus particulièrement dans la régulation des récepteurs AMPA. Dans les neurones matures en culture, les récepteurs AMPA et l'actine de type F, une composante du cytosquelette, sont colocalisés au niveau des sites synaptiques sur les épines dendritiques. En dépit du fait que l'actine-F soit présente ailleurs dans le neurone, on retrouve la plus grande concentration au niveau des épines dendritiques, et ce, plus particulièrement dans les épines dendritiques riches en sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (Allison et coll., 1998). Dans les neurones répondant au neurotransmetteur de type GABA, l'actine-F interagirait avec la protéine GRIP afin de concentrer les récepteurs AMPA au niveau de la densité postsynaptique sans toutefois être responsable de leur maintien au sein de ces sites. Au contraire, dans les neurones des cellules pyramidales de l'hippocampe, l'actine-F agirait pour concentrer et maintenir les récepteurs AMPA au sein de la densité postsynaptique. De plus, elle interagirait plus particulièrement avec la sous-unité GluR1 (Allison et coll., 1998). Le cytosquelette, et tout particulièrement l'actine-F, serait donc un acteur important dans la régulation des récepteurs AMPA.

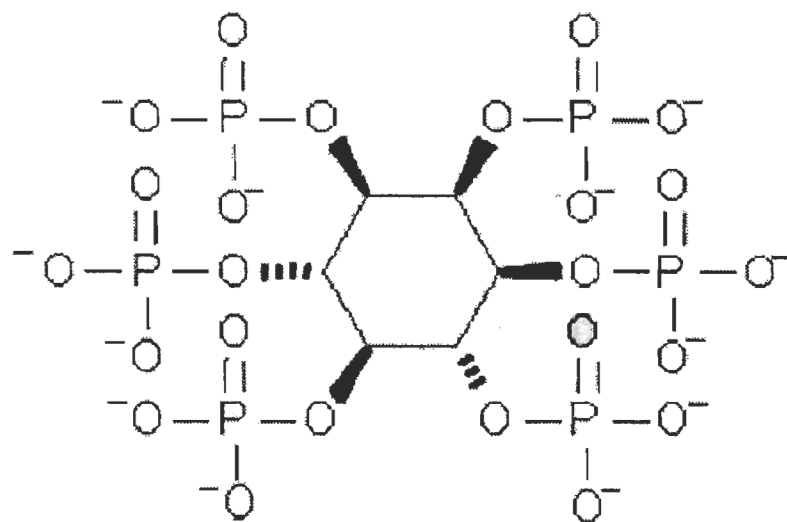
L'adaptine, dont il a été question précédemment, est une autre protéine reconnue pour interagir avec le récepteur AMPA. Des études d'immunoprécipitation sur des neurones en culture ont montré que la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA est fortement liée à l'adaptine suggérant donc que ce récepteur est sous l'influence d'une endocytose classique faisant intervenir les puits de clathrine et l'adaptine. À l'heure actuelle, les mécanismes cellulaires susceptibles d'affecter cette forme d'endocytose tributaire de la clathrine et, par le fait même, la distribution cellulaire des récepteurs AMPA nécessitent une investigation substantielle.

## 1.5 INTERACTIONS DES INOSITOLS PHOSPHATES AVEC L'ADAPTINE

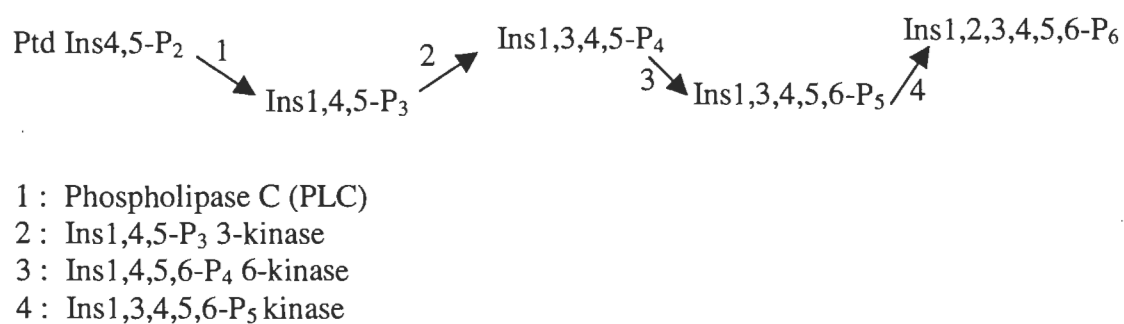
Dans plusieurs types cellulaires on reconnaît l'importance des inositols phosphates pour le contrôle de multiples fonctions. Sans contredit, l'inositol triphosphate (IP3) par son action de mobilisation intracellulaire de l'ion calcium, s'avère le plus connu et le plus étudié des inositols. Depuis quelques années, il a été démontré que la transformation, par une série de phosphorylations, de ce métabolite cellulaire en multiple composés, notamment en IP6, peut conduire à des effets cellulaires et moléculaires qui dépassent de loin le simple contrôle du niveau de calcium. À titre d'exemple, de nombreuses études scientifiques ont été conduites jusqu'à maintenant afin de clarifier le rôle physiologique de cet inositol qui, avec l'IP5, sont les plus abondants inositols dans la majorité des cellules où leurs concentrations varient de 10 à 100  $\mu\text{M}$  (Pittet et coll., 1989; Jackson et coll., 1987; Heslop et coll., 1985). Bon nombre de ces études confèrent à l'IP6 un rôle anti-oxydant. En effet, l'IP6 bloque efficacement la formation catalysée par le fer du radical hydroxyl et diminue de façon significative la peroxydation lipidique (Hawkins et coll., 1993; Graf et coll., 1987). En plus de ces propriétés anti-oxydantes, l'IP6 aurait une action antinéoplasique. L'administration orale d'IP6 exerce une action chimiopréventive et chimiothérapeutique dans la carcinogénèse des tumeurs du sein et du colon chez les rongeurs (Shamsuddin et coll., 1988; Shamsuddin et coll., 1989; Vucenik et coll., 1992). Cet effet antinéoplasique de l'IP6 pourrait être relié à l'inhibition de la formation du radical hydroxyl et à la diminution de la peroxydation lipidique (Graf et coll., 1987).

De plus, les concentrations physiologiques d'IP6 modulent l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type L dans les cellules sécrétrices d'insuline. Cette modulation s'exerce par l'inhibition de l'activité sérine-thréonine phosphatase (Larson et coll., 1997). L'IP6 réduirait aussi la désensibilisation induite par la lumière de la rhodopsine (Palczewski et coll., 1992). Dans ce cas-ci, l'IP6 agirait en se liant directement à l'arrestine, une classe spéciale de protéines régulatrices. Concernant le cerveau, bon nombre de sites de liaison de l'IP6 ont été identifiés dont un sur le domaine

C2B de la synaptotagmine (Fukuda et coll., 1994), une protéine à laquelle on attribue un rôle de détecteur calcique pour la régulation des processus d'exocytose dans les neurones.



**FIGURE 9.** Structure de l'inositol hexakisphosphate (IP6).



**FIGURE 10.** Voie métabolique simplifiée des inositols

En plus des nombreux effets rapportés ci-haut, l'IP6 possède une étonnante capacité à se lier à la sous-unité  $\alpha$  de l'AP-2. Suivant cette interaction de l'IP6 avec la sous-unité  $\alpha$  de l'AP-2, il a été démontré que la sous-unité  $\beta$  devenait inaccessible pour la clathrine (Beck et Keen, 1991). Par conséquent, l'IP6 pourrait avoir un rôle potentiel à jouer dans la modulation du nombre de récepteurs membranaires puisqu'elle interfère avec l'AP-2, une adaptine essentielle à l'endocytose des récepteurs (Voglmaier et coll., 1992). Cependant, d'autres travaux seront nécessaires pour appuyer l'hypothèse voulant que l'IP6 puisse intervenir dans la régulation des processus cellulaires d'endocytose des récepteurs.



# OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

## MISE EN SITUATION DE LA PROBLÉMATIQUE

La section précédente a soulevé l'importance du neurotransmetteur glutamate et de ses récepteurs dans le contrôle des fonctions élémentaires du cerveau, notamment dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Par ailleurs, un bon nombre d'études électrophysiologiques ont révélé que l'activation des récepteurs glutamatergiques peut contribuer largement à la production de la LTP, un modèle synaptique de mémorisation. Sur le plan pathologique, la section précédente a également soulevé l'importance des récepteurs au glutamate dans l'apparition de maladies neurodégénératives. En effet, de nombreuses études ont démontré que l'activation excessive des récepteurs glutamatergiques peut engendrer des effets particulièrement délétères pour les neurones. Ces effets néfastes seraient attribuables, en partie, à la capacité qu'ont les récepteurs au glutamate à favoriser une accumulation inhabituellement élevée d'ions calcium dans la structure postsynaptique. Dans ce contexte général, l'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires assurant la régulation des récepteurs au glutamate constitue pour la majorité des neurobiologistes l'une des étapes cruciales pour la compréhension du fonctionnement normal et pathologique du cerveau.

Plusieurs analyses biochimiques ont révélé la présence de modifications des récepteurs au glutamate dans le cerveau d'animaux soumis à des conditions pathologiques susceptibles d'engendrer de la dégénérescence neuronale. Par ailleurs, on retrouve dans la littérature bon nombre d'études appuyant l'importance spécifique de la régulation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA dans l'établissement des processus cognitifs, notamment lors de l'acquisition de la mémoire spatiale. À l'échelle moléculaire, des expériences récentes ont démontré la présence d'interactions des récepteurs AMPA avec de multiples protéines susceptibles de contribuer au recyclage des récepteurs membranaires. Parmi ces protéines, l'adaptine (AP-2) semble capable d'interagir avec les récepteurs AMPA et de nombreuses recherches sont actuellement en cours afin d'identifier les processus cellulaires responsables du contrôle de cette

interaction. Les travaux présentés dans le cadre du présent mémoire s'intéressent aux effets de l'inositol hexakisphosphate (IP6) sur la régulation des récepteurs AMPA. L'IP6 est reconnue comme l'une des substances intracellulaires susceptible de bloquer l'interaction de l'adaptine avec plusieurs protéines membranaires sujettes notamment, à l'endocytose, et l'objectif général de mémoire visera à élucider les effets potentiels de cet inositol sur la distribution cellulaire des récepteurs glutamatergiques.

### **Objectifs spécifiques**

Des études biochimiques sont ici proposées afin d'évaluer l'impact de l'IP6 sur la régulation des récepteurs au glutamate dans des coupes minces de cerveau. En ce sens, ce projet de maîtrise regroupe plusieurs expériences dont le but est d'aborder les questions suivantes :

- 1) Est-ce que la liaison aux récepteurs de type AMPA est modulée par l'IP6 ?

*Contexte :* Le premier volet de ce projet de maîtrise étudie la possibilité d'une perturbation des récepteurs au glutamate suite à un traitement à l'IP6. Cette partie de mon travail implique l'analyse qualitative des propriétés de liaison des récepteurs au glutamate sur des sections minces de cerveau préalablement traitées à l'IP6. Cette approche consiste à évaluer la liaison de ligands radioactifs spécifiques aux récepteurs AMPA (3H-AMPA et 3H-CNQX) sur sections de cerveau portées sur lames de verre. Au cours des dernières années, notre laboratoire a eu recours à cette méthode afin d'étudier les mécanismes de régulation des récepteurs au glutamate notamment en ce qui a trait au contrôles des récepteurs AMPA par des enzymes dépendantes du calcium. Par cette approche expérimentale, des expériences préliminaires furent effectuées afin d'établir les conditions optimales de la régulation potentielle des récepteurs AMPA par l'IP6.

- 2) Est-ce que la liaison aux récepteurs glutamatergiques est modulée de manière différentielle par l'IP6 et ce, dans les diverses régions cérébrales chez le rat ?

*Contexte :* Deux types de récepteurs au glutamate sont habituellement impliqués dans les phénomènes de transmission neuronale. En effet, des études prenant avantage de l'utilisation d'antagonistes spécifiques, comme l'AP-5 et le CNQX, ont grandement contribué aux connaissances actuelles de la fonction des récepteurs au glutamate. On sait, par exemple, que l'activation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA est nécessaire pour la production de la majorité des réponses excitatrices rapides assurées par le glutamate. En ce qui a trait au récepteur de type NMDA, sa contribution dans les processus de transmission synaptique est normalement requise lors de stimulation intense de neurones. Sur le plan biochimique, il est possible d'analyser ces deux grands types de récepteurs notamment, par l'utilisation de la technique d'autoradiographie quantitative. L'avantage de cette technique réside principalement dans sa capacité à établir les changements apportés aux récepteurs dans diverses structures d'intérêt. Ainsi, nous prendrons avantage de l'autoradiographie quantitative pour déterminer les effets de l'IP6 sur les différents types de récepteurs glutamatergiques et ce, dans les diverses régions du cerveau.

- 3) Est-ce que la distribution des récepteurs glutamatergiques à l'échelle des compartiments cellulaires est affectée par la présence d'IP6 ?

*Contexte :* Dans une autre série d'expériences, il est prévu d'étudier l'impact de l'IP6 sur la distribution des récepteurs au glutamate à l'échelle des compartiments cellulaires. L'IP6, tout comme d'autres inositols phosphates, est susceptible d'interférer avec les phénomènes d'exocytose et d'endocytose de multiples protéines et des expériences d'immunobuvardage de type Western seront effectuées afin d'analyser les effets de ce composé sur la distribution cellulaire des récepteurs glutamatergiques. Plus spécifiquement, on verra à étudier l'action de l'IP6 sur l'immunoréactivité des récepteurs AMPA et NMDA dans les compartiments membranaires et intracellulaires

des cellules nerveuses. Sur le plan biochimique, la technique traditionnelle de centrifugation différentielle sera employée afin de purifier les compartiments cellulaires d'intérêts.

4) Est-ce que la distribution des récepteurs au glutamate à l'échelle des compartiments cellulaires est contrôlée par l'adaptine ?

*Contexte :* À ce jour, les travaux biochimiques réalisés sur les neurones montrent qu'une majorité de récepteurs AMPA (environ 70%) sont localisées à l'intérieur même des cellules nerveuses et ce, en tant que récepteurs de réserve. Or, des études récentes ont démontré que cette localisation préférentielle des récepteurs AMPA à l'échelle des compartiments intracellulaires découle vraisemblablement d'une dynamique particulière de régulation favorisant, entre autres, l'endocytose des récepteurs à partir des compartiments membranaires. Sur le plan moléculaire, l'interaction de l'AP-2 avec le récepteur AMPA apparaît cruciale comme étape assurant l'endocytose du récepteur, tout spécialement par le processus classique d'internalisation assurée par des vésicules tapissées de clathrine. L'IP6 est reconnue pour interagir directement avec l'AP-2, un effet susceptible de freiner l'endocytose de diverses composantes membranaires. Or, on pourrait s'attendre à ce que la distribution des récepteurs AMPA puisse être affectée par des substances dont l'action serait d'interférer avec l'adaptine. Dans cette optique, nous prendrons évidemment avantage de l'utilisation de tels composés notamment, de l'héparine et l'élastase, afin d'évaluer cette possibilité. Sur le plan méthodologique, on verra à étudier par les techniques d'autoradiographie quantitative et d'immunobuvardage de type Western, l'action de ces substances sur la liaison du 3H-AMPA et sur l'immunoréactivité des récepteurs.

### **Importance et originalité de la recherche**

Nous souhaitons, par l'ensemble de ces travaux, élucider les mécanismes de régulation des récepteurs glutamatergiques. Dans une perspective élargie, les retombées

potentielles de ces études pourront aider à la compréhension des processus moléculaires de la mémoire, compte tenu de l'importance de ces récepteurs dans l'apprentissage. De plus, les données obtenues devraient permettre une meilleure compréhension de la nature de certains désordres neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie, deux affections pour lesquelles on observe un changement important des récepteurs glutamatergiques.

# **CHAPITRE 2**

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **2.1 ÉTUDES DE RADIOLIAISON ET AUTORADIOGRAPHIE**

#### **2.1.0 Matériels**

Les rats Sprague-Dawley proviennent de chez Anilab Enr (Québec, Canada). Le [ $^3\text{H}$ ]AMPA (activité spécifique 53.1 Ci/mmol $^{-1}$ ) et le [ $^3\text{H}$ ]GLUTAMATE (activité spécifique 49.4 Ci/mmol $^{-1}$ ) proviennent de NEN Life Science (Boston, MA, États-Unis). L'inositol hexakisphosphate (IP6), l'inositol hexasulfate (IS6), l'héparine et l'élastase ont été achetés chez Sigma (Oakville, Ontario, Canada).

#### **2.1.1 Préparation du tissu cérébral**

Des rats Sprague-Dawley (mâles 100g à 250g) furent anesthésiés sous une cloche en utilisant le méthoxyflurane (METOFANE ; Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, États-Unis). Suivant une décapitation, leurs cerveaux furent rapidement prélevés et immédiatement congelés par immersion dans l'isopentane (2-méthylbutane) à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour ensuite être conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de la coupe. Des sections horizontales de 10 $\mu\text{m}$  d'épaisseur, au niveau des hippocampes, ont été coupées dans un microtome réfrigéré (cryostat) et adhérees par brève décongélation sur des lames de verre enrobées d'une gélatine au sulfate de potassium chromique. Les lames sur lesquelles se retrouvent les coupes minces de cerveaux de rats furent conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en vue de leur utilisation ultérieure.

### 2.1.2 Traitement des coupes

Des sections adjacentes furent décongelées rapidement et incubées immédiatement en présence ou non de 200  $\mu$ M d'IP6 dans 50 ml de tampon Tris-acétate (T/A) (100mM, pH 7.4; 100  $\mu$ M d'EGTA). L'inositol hexasulfate (IS6), l'héparine et l'élastase sont des composés qui furent également testés. L'incubation fut d'une durée d'une heure à une température de 35°C. Une fois l'incubation terminée, les lames furent immergées brièvement dans un tampon T/A glacé (100mM, pH 7.4; 100  $\mu$ M d'EGTA) puis incubées avec différents ligands radioactifs.

### 2.1.3 Étude des récepteurs AMPA par épreuve de liaison

Suite à cette rapide immersion dans le tampon T/A glacé, les coupes furent incubées durant 45 min. à 0-4°C dans du T/A (50mM, pH 7.4; 100 $\mu$ M d'EGTA) contenant 50mM de thiocyanate de potassium et en présence de 30 nM (étude globale en frottis) ou 40 nM (autoradiographie) de [ $^3$ H]AMPA. La liaison non-spécifique a été définie comme étant celle obtenue en présence de 10 mM de L-glutamate (Glu). Les lames furent ensuite rincées par lavages successifs : 2 fois durant 10 secondes dans du tampon d'incubation glacé, une fois durant 5 secondes dans le même tampon dilué à 50%, suivi par trois trempettes dans de l'eau distillée. Par la suite, les coupes furent soit rapidement enlevées par frottis avec un filtre GF/C, la liaison spécifique du ligand étant déterminée par mesure de la radioactivité résiduelle à l'aide d'un compteur à scintillation, soit séchées sous un jet d'air chaud en vue de leur utilisation en autoradiographie.

### 2.1.4 Étude des récepteurs NMDA par épreuve de liaison

Les coupes furent incubées durant 45 min à 0-4°C avec 150 nM (étude globale en frottis) ou 190 nM (autoradiographie) de [ $^3$ H]Glu dans du T/A (50 mM, pH 7.4; EGTA 100  $\mu$ M ) contenant 5  $\mu$ M d'AMPA, 2  $\mu$ M d'acide kaïnique et 20  $\mu$ M de quisqualate

dans le but de prévenir la liaison du [ $^3\text{H}$ ]Glu aux sites non-NMDA. On ajoute également 100  $\mu\text{M}$  de SITS (acide 4-acétanido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonique) afin de bloquer les sites de recapture du Glu. La liaison non spécifique a été définie comme étant celle obtenue en présence de 10 mM de Glu et de 1 mM de NMDA. Les coupes furent ensuite rincées par lavages successifs : 2 fois durant 15 sec. dans du tampon d'incubation glacé, une fois durant 5 sec. dans le même tampon dilué à 50%, suivi par trois trempettes dans de l'eau distillée. Puis elles furent rapidement enlevées par frottis ou séchées sous un jet d'air chaud en vue de leur utilisation en autoradiographie.

### 2.1.5 Autoradiographie quantitative

Des films à émulsion d'argent sensible au tritium (Hyperfilm- $^3\text{H}$ ; Amersham-Pharmacia, Baie-D'Urfé, Canada) furent exposés pendant 11 jours ( $^3\text{H}$ AMPA) ou 21 jours ( $^3\text{H}$ Glu) en présence des coupes séchées et d'étalons de tritium ( $^3\text{H}$ -microscales; Amersham-Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada). Les films furent développés en utilisant le développeur et le fixateur GBX de Kodak, puis analysés à l'aide d'un système d'analyse d'images (MCID ver 3.0; Imaging Research). Après leur mesure sur le système, les densités optiques au niveau de différentes régions cérébrales furent converties en unités radioactives à l'aide des bandes étalons présentes sur le film. Les images furent saisies sur pellicule négative 35 mm (T-MAX 100; Kodak) à l'aide d'un enregistreur photographique (FotoColor; AGFA), puis imprégnées sur papier photographique (RC RAPID; Ilford).

### 2.1.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques furent effectuées à l'aide d'un logiciel d'analyse statistique (GraphPAD InStat, ver 1.14, 1990; GraphPAD Software, USC). Les analyses de variances ont été effectuées avec un test ANOVA à deux dimensions et furent suivies d'un test t post hoc; les valeurs  $p < 0.05$  furent considérées comme étant un indicateur d'une différence significative entre les moyennes comparées.



## **2.2 ÉTUDES BIOCHIMIQUES DES RÉCEPTEURS AMPA ET NMDA**

### **2.2.0 Matériels**

Les rats Sprague-Dawley proviennent de chez Anilab Enr (Québec, Canada). Les standards de poids moléculaires, le TEMED, le persulfate d'ammonium, le bleu de Coomassie et l'acrylamide proviennent de chez Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Les anticorps GluR1 et GluR2/3 ont été achetés chez Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, Etats-Unis). L'anticorps GluR2 provient de chez Chemicon (Temecula, CA, Etats-Unis). Quant aux anticorps NR1 et NR2a ils ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Etats-Unis). Les réactifs pour la détection par chimiluminescence proviennent de chez Roche-Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada).

### **2.2.1 Préparation du tissu cérébral**

Les rats Sprague-Dawley (mâles 100g à 250g) furent anesthésiés sous une cloche en utilisant le méthoxyflurane (METOFANE ; Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, États-Unis). Suivant une décapitation, leurs cerveaux furent rapidement prélevés et immédiatement congelés par immersion dans l'isopentane (2-méthylbutane) à -20°C pour ensuite être conservés à -80°C jusqu'au moment de la coupe. Des sections horizontales de 30µm d'épaisseur, au niveau des hippocampes, ont été réalisées dans un microtome réfrigéré (cryostat) et adhérees sur des lames de verre enrobées d'une gélatine au sulfate de potassium chromique. Les lames sur lesquelles se retrouvent les coupes minces de cerveaux de rats furent conservées à -80°C en vue de leur utilisation ultérieure.

### **2.2.2 Traitement des coupes**

Après une décongélation rapide, les lames furent immédiatement incubées à 35°C dans 50 ml de tampon Tris-Acétate (100mM, pH 7.4; EGTA 100μM). La moitié des lames ont été incubées dans du T/A seulement (condition contrôle) et l'autre moitié dans du T/A en présence d'IP6 200μM (inositol hexakisphosphate extrait de riz). Par la suite, les conditions suivantes : 100 U.I. (2 U.I./ml) d'héparine, ou 200μM d'IS6 (inositol hexasulfate), furent ajoutées aux deux conditions précédentes.

### **2.2.3 Homogénéisation du tissu cérébral**

Après un rapide lavage dans du T/A à 4°C (100 mM, pH 7.4; contenant 100 μM d'EGTA), les coupes furent récupérées à l'aide d'une lame de rasoir et immergées dans une solution de sucrose 320 mM à 4°C contenant de l'EGTA 100μM et de l'EDTA 100μM. La solution de sucrose contenait également les inhibiteurs suivants : leupeptine 5 μM, PMSF 200 μM et TCPK 1 μg/ml. Les coupes ont par la suite été homogénéisées, à 4°C, dans un tube de verre à l'aide d'une tige en téflon et d'une perceuse (montage maison). Les homogénats obtenus (homogénat contrôle et homogénat IP6) ont par la suite été soumis à un processus de centrifugations différentielles (Henley, 1995).

### **2.2.4 Centrifugations différentielles des homogénats**

Les homogénats furent centrifugés 10 min. à 1000 x g afin d'enlever les débris cellulaires, la substance blanche et les méninges ayant pu rester sur le cortex. Les centrifugations se déroulent à 4°C. Le surnageant fut soigneusement prélevé et immédiatement placé sur la glace. Quant au culot obtenu, il fut resuspendu dans du sucrose 320mM contenant toujours de l'EGTA, de l'EDTA et des inhibiteurs aux mêmes concentrations décrites précédemment. Une autre centrifugation de 10 min. à 1000 x g eut lieu. Le surnageant résultant de cette deuxième centrifugation fut ajouté au

urnageant précédent. Par la suite, le culot (P1) obtenu, qui ne contenait que des débris cellulaires et des noyaux, fut jeté.

Les pools de surnageants furent centrifugés 20 min. à 10 500 x g. Les surnageants furent gardés sur la glace et les culots resuspendus dans le sucrose. Après une deuxième centrifugation de 20 min. à 10 500 x g, les surnageants furent ajoutés aux précédents. Les culots 2 (P2) furent resuspendus dans du T/A à 4°C (50mM, pH 7.4; EGTA 100µM, EDTA 100µM) ainsi que les mêmes inhibiteurs aux mêmes concentrations que pour le sucrose) pour ensuite les centrifuger 20 min. à 10 500 x g. Une série de 4 lavages au T/A eut lieu en effectuant des centrifugations de 20 min. à 22 500 x g. Après les lavages, les fractions P2 furent resuspendues dans du T/A et conservées à -80°C. Les pools de surnageants des culots P2 furent centrifugés 1h30 à 100 000 x g. Les culots obtenus (P3) furent resuspendus dans du T/A et conservés à -80°C. Le surnageant issu de cette ultracentrifugation ne fut pas conservé.

Le culot 2 (P2) représente la partie synaptosomale des récepteurs glutamatergiques. On retrouve donc dans P2, les récepteurs glutamatergiques qui sont dans la membrane synaptique. Quant à la fraction P3, elle représente la partie synaptosomale, c'est-à-dire les récepteurs retrouvés à l'intérieur du neurone. Pour un résumé voir le schéma expérimental.

### **2.2.5 Dosage des protéines par spectroscopie UV-visible**

Les concentrations de protéines dans P2 et P3 sont déterminées par la méthode colorimétrique de Bradford et coll. (1979). Des concentrations croissantes de BSA (albumine bovine) sont utilisées afin de définir une courbe étalon. Les quantités de BSA utilisées dans l'établissement de la courbe étalon varient entre 0 et 60 µg. Par la suite, les échantillons sont dosés de la façon suivante. Pour 15 µl de protéines à doser, 735 µl de tampon T/A et 250 µl de colorant Bio-Rad sont ajoutés. Après une attente de 20 minutes, l'absorbance est mesurée à 595 nm.

### 2.2.6 Électrophorèse SDS-Page

Les électrophorèses ont été effectuées en utilisant l'appareil Mini Protean II de Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Les échantillons en concentrations égales furent déposés sur un gel de polyacrylamide 8% pour le gel de résolution et de 3% pour le gel de compression dont l'épaisseur était de 1.5 mm. Par la suite un courant de 200V fut appliqué, et ce, pendant environ 45min. Des deux gels obtenus, un fut coloré au bleu de Coomassie et l'autre fut conservé en vue du transfert de type immunoblot (Western blot).

### 2.2.7 Analyse par transfert de type Western blot

Le transfert s'effectua en appliquant un courant de 25V pendant toute la nuit à 4°C. La solution de transfert est composée de Tris-base 50 mM, de glycine 380 mM, de SDS 0.1% et de méthanol 20%. Par la suite, la membrane de nitrocellulose 0.45 µm fut colorée à l'aide de ponceau S pour s'assurer que le transfert s'était bien effectué.

La membrane de nitrocellulose fut par la suite incubée 1 heure à la température de la pièce dans du PBS-lait 5% pour bloquer les sites de liaison non-spécifiques de l'anticorps. La membrane fut par la suite incubée avec l'anticorps primaire GluR1, GluR2/3, NR1 ou NR2a. 2,5µl d'anticorps anti-GluR1, 9µl d'anticorps anti-GluR2/3, 2,5µl d'anticorps GluR2, 5µl d'anticorps NR1 ou 5µl d'anticorps NR2a dans 10 ml de PBS-lait 5% à la température de la pièce furent utilisés. La membrane fut lavée 2 fois dans du PBS puis 2 autres fois dans du PBS-lait 5%. Chaque lavage fut d'une durée de 10 min. La seconde incubation, d'une durée de 30 min. à la température de la pièce, eut lieu en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxidase. Quatre lavages au PBS (d'une durée de 10 min. chacun) suivirent la seconde incubation. Après ces lavages, la solution de révélation qui contient du luminol fut ajoutée sur la membrane en laissant agir cette dernière pendant 1 min. La membrane fut par la suite exposée sur un

film autoradiographique développé après une minute d'exposition (le temps d'exposition pouvant être ajusté si nécessaire). Les films furent développés à l'aide de développeur et de fixateur GBX de Kodak, puis analysés sur système d'analyse d'image (MCDI ver 3.0, Imaging Research). Les densités optiques des bandes furent comparées entre elles.

# CHAPITRE 3

## RÉSULTATS

*QUESTION 1: Est-ce que la liaison aux récepteurs glutamatergiques de type AMPA se voit modulée par l'IP6?*

### 3.1 ANALYSE QUALITATIVE DE L'EFFET DE L'IP6 SUR LES RÉCEPTEURS GLUTAMATERGIQUES DE TYPE AMPA ET NMDA

Afin de révéler un effet potentiel de l'IP6 sur les récepteurs AMPA, des sections horizontales de cerveaux de rats de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur furent préincubées à 35°C en présence de différentes concentrations d'IP6 (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  et 500 $\mu\text{M}$ ). À la suite de cette préincubation, l'effet de l'IP6 est stoppé par une brève période de lavage dans un tampon T/A à 0°C. Les sections furent par la suite incubées en présence de [ $^3\text{H}$ ]AMPA afin d'analyser la liaison de base des récepteurs.

Tel que présenté à la Figure 11, on constate que l'IP6 produit une augmentation dose-dépendante de la liaison au [ $^3\text{H}$ ]AMPA. L'effet de l'IP6 débute à 10  $\mu\text{M}$  et est maximal à 100  $\mu\text{M}$  avec une augmentation de la liaison de l'ordre de 50% par rapport à la situation contrôle. Quant aux concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$ , l'effet de l'IP6 tend à demeurer stable (**Fig. 11**).

On constate par ailleurs que l'action de l'IP6 sur le récepteur AMPA découle vraisemblablement d'une activité cellulaire fondamentale compte tenu de l'absence de modulation par l'IP6 dans les sections maintenues à la température de la pièce (22°C). Dans cette condition, l'effet maximal observé est de seulement 4 % ( $4 \pm 4\%$ ; moyenne  $\pm$  erreur-type obtenue chez 5 rats avec 3 mesures par animal) par rapport à une augmentation maximale et significative de 50 % ( $50 \pm 4\%$ ; moyenne  $\pm$  erreur-type

obtenue chez 5 rats avec 3 mesures par animal et significative de  $p < 0.01$  selon le t-test de Student) pour une incubation à la température physiologique de 35°C (**Fig. 12**).

Par rapport à la spécificité d'action de l'IP6, on note que le composé a relativement peu d'effet sur la liaison au récepteur NMDA, du moins lorsque que cette spécificité est mesurée sur l'ensemble des régions du cerveau. En effet, pour une concentration de 200  $\mu$ M d'IP6, l'effet est pratiquement inexistant ( $98,5 \pm 9,2$  %).

*QUESTION 2: Est-ce que la liaison aux récepteurs glutamatergiques est modulée de manière différentielle par l'IP6 et ce, dans les diverses régions du cerveau de rat?*

### **3.2 ANALYSE QUANTITATIVE DE L'EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON DU [<sup>3</sup>H]AMPA DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CERVEAU**

Par l'utilisation de l'autoradiographie quantitative, les niveaux de modulation de l'IP6 furent établis. Plus spécifiquement, des sections de cerveaux de rats furent préincubées à 35°C en présence ou en absence de 200  $\mu$ M d'IP6 pour être ultérieurement utilisées afin d'évaluer l'effet des traitements contrôle et IP6 sur la liaison du [<sup>3</sup>H]AMPA aux différentes régions cérébrales. L'examen visuel d'un autoradiogramme (**Fig. 13**) permet de constater que l'IP6 cause une importante augmentation de la liaison spécifique du [<sup>3</sup>H]AMPA, et ce, particulièrement au niveau de l'hippocampe et du cervelet. D'un point de vue quantitatif, on peut constater que l'augmentation de la liaison du [<sup>3</sup>H]AMPA suite à un traitement à l'IP6 est répartie uniformément dans les différentes régions de l'hippocampe. Le traitement à l'IP6 cause une augmentation qui varie entre 20 et 30 % pour les régions CA<sub>1</sub> et CA<sub>3</sub> du strata radiatum et oriens ainsi que pour le gyrus dentatus. On note par ailleurs une augmentation modérée de l'ordre d'environ 15% de la liaison de l'AMPA tritié dans le cortex interne. De toutes les

régions analysées, c'est le cervelet qui présente l'augmentation la plus élevée de la liaison du [ $^3\text{H}$ ]AMPA avec une hausse de près de 90%. L'histogramme de la figure (**Fig. 14**) illustre l'augmentation de la liaison de l'AMPA tritié dans les différentes régions du cerveau.

### 3.2.1 Effet de l'IP6 sur les propriétés de liaison des récepteurs AMPA dans l'hippocampe

Afin de caractériser les mécanismes assurant cette hausse de liaison, des expériences de saturation à l'équilibre furent effectuées. Ce type d'expérience permet de déterminer si les changements de la liaison du [ $^3\text{H}$ ]AMPA sont dus à une variation dans le nombre de récepteurs ou à une différence au niveau de l'affinité du récepteur pour son agoniste. Concrètement, il est possible, en étudiant la liaison de concentrations croissantes de ligand radioactif, d'obtenir des estimations précises des niveaux d'affinité ( $K_d$ ) et de liaison maximale ( $B_{\max}$ ) d'un récepteur. Les données obtenues par une étude de saturation peuvent être représentées sur un graphique de type Scatchard.

Les études de saturation effectuées dans le stratum radiatum de la région  $\text{CA}_1$  de l'hippocampe donnent un graphique de Scatchard linéaire (**Fig. 15**). Selon le Scatchard, le  $K_D$  est de  $154 \pm 26$  nM pour le contrôle et de  $179 \pm 14$  nM pour les coupes traitées avec 200  $\mu\text{M}$  d'IP6, l'augmentation de  $K_D$  obtenue n'étant pas significative. Le  $K_D$  résulte de la moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue chez 6 rats avec 4 mesures par animal. Quant au  $B_{\max}$ , il est de  $7.2 \pm 0.34$  pmol/mg de protéines pour les coupes contrôles et de  $11.9 \pm 0.3$  pmol/mg de protéines dans les sections traitées à l'IP6, ce qui représente une augmentation de près de 65 %. Encore une fois, le  $B_{\max}$  a été obtenu en faisant la moyenne  $\pm$  l'erreur-type chez 6 rats avec 4 mesures par animal. Cette augmentation du  $B_{\max}$  est significative selon le test t de Student ( $p < 0.01$ ).



### 3.3 EFFET DE L'IP6 SUR LA LIAISON SPÉCIFIQUE DU [<sup>3</sup>H]GLUTAMATE DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CERVEAU

Dans le but de s'assurer de la spécificité de l'action de l'IP6 sur le récepteur AMPA, des études de liaison au récepteur NMDA furent conduites en utilisant cette fois-ci le ligand radioactif [<sup>3</sup>H]GLUTAMATE. Contrairement au cas du récepteur AMPA, l'examen visuel d'un autoradiogramme permet de constater qu'il ne semble pas y avoir d'augmentation de la liaison du [<sup>3</sup>H]GLUTAMATE suite au traitement à l'IP6. Cette observation fut confirmée lors de l'analyse quantitative des autoradiogrammes qui ne montre aucune augmentation significative de la liaison du [<sup>3</sup>H]GLUTAMATE, et ce, pour toutes les régions cérébrales analysées (**Fig. 16**).

*QUESTION 3: Est-ce que la distribution des récepteurs glutamatergiques à l'échelle des compartiments cellulaires se voit affectée par la présence d'IP6?*

### 3.4 EFFET DE L'IP6 SUR LA DISTRIBUTION CELLULAIRE DES RÉCEPTEURS AMPA

Des coupes de cerveaux de rats d'une épaisseur de 30 µm furent incubées pendant 60 min. à 35°C, et ce, en présence ou non de 200 µM d'IP6. À la suite de cette incubation, les coupes furent récupérées, homogénéisées et les centrifugations différentielles furent exécutées. Ces diverses centrifugations permirent d'obtenir les fractions synaptosomales (P2) et microsomales (P3) qui représentent, respectivement, les récepteurs membranaires et les récepteurs enfouis dans le cytosol neuronal. Par la suite, l'immunobuvardage des échantillons obtenus en utilisant des anticorps dirigés contre les sous-unités GluR1, GluR2 et GluR2/3 des récepteurs AMPA eut lieu.

L'incubation avec l'IP6 cause une augmentation de l'immunoréactivité dans la fraction synaptosomale (P2) pour toutes les sous-unités précédemment citées du récepteur AMPA. Pour la sous-unité GluR1, l'augmentation est de  $31 \pm 8.30$  % lors d'un traitement avec 200  $\mu$ M d'IP6 comparativement à la situation contrôle. Concernant la sous-unité GluR2, l'immunoréactivité est accrue de  $30.4 \pm 7.52$  % tandis que pour GluR2/3 cette augmentation se chiffre à  $25.9 \pm 6.43$  % (**Fig. 17**). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 4 animaux différents.

Concernant la fraction microsomale (P3), l'incubation avec 200  $\mu$ M d'IP6 génère une diminution de l'immunoréactivité, et ce, pour toutes les sous-unités du récepteur AMPA qui furent analysées. Dans le cas de la sous-unité GluR1, la diminution de l'immunoréactivité suite à un traitement à l'IP6 est de  $28.7 \pm 6.74$  % comparativement à la situation contrôle. Quant aux sous-unités GluR2 et GluR2/3, la diminution est respectivement de  $27.4 \pm 5.26$  % et de  $23.8 \pm 6.19$  % (**Fig. 18**). Encore une fois, les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 4 animaux différents.

### **3.5 EFFET DE L'IS6 SUR LA MODULATION DE LA SOUS-UNITÉ GLUR1 DU RÉCEPTEUR AMPA**

Comme l'IP6 est une molécule chimiquement très chargée, on utilisa l'inositol hexasulfate (IS6) afin de vérifier que la modulation du récepteur AMPA par l'IP6 n'était pas seulement un effet de charge. Des coupes de cerveaux de rats d'une épaisseur de 30  $\mu$ m furent incubées pendant 60 min. à 35°C avec ou sans 200  $\mu$ M d'IP6 de même qu'en présence de 200  $\mu$ M d'IS6. Par la suite, la fraction synaptosomale (P2) fut isolée par centrifugations différentielles. Avec l'IP6, l'augmentation de l'immunoréactivité est de  $32.3 \pm 9.6$  % comparativement au contrôle pour la sous-unité GluR1. Avec l'IS6, l'augmentation de l'immunoréactivité est de  $1.2 \pm 8.3$  % par rapport au contrôle (**Fig.**

19). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 2 animaux différents.

### 3.6 EFFET DE L'IP6 SUR LA DISTRIBUTION CELLULAIRE DES RÉCEPTEURS NMDA

L'immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les sous-unités NR1 et NR2A du récepteur NMDA fut aussi réalisé. En accord avec les résultats précédemment obtenus en autoradiographie, un traitement avec 200  $\mu$ M d'IP6 n'affecte l'immunoréactivité d'aucune des 2 sous-unités étudiées pour les récepteurs NMDA. Autant dans la fraction synaptosomale (diminution de  $2.5 \pm 8.1$  % pour la sous-unité NR1 et augmentation de  $4.3 \pm 5.8$  % pour la sous-unité NR2A) que microsomale (diminution de  $6.9 \pm 7.0$  % pour la sous-unité NR1 et augmentation de  $8.0 \pm 4.4$  % pour la sous-unité NR2A) l'immunoréactivité n'est altérée (**Fig. 20** et **Fig. 21**). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 4 animaux différents.

*QUESTION 4: Est-ce que la distribution des récepteurs au glutamate à l'échelle des compartiments cellulaires se voit contrôlée par l'adaptine?*

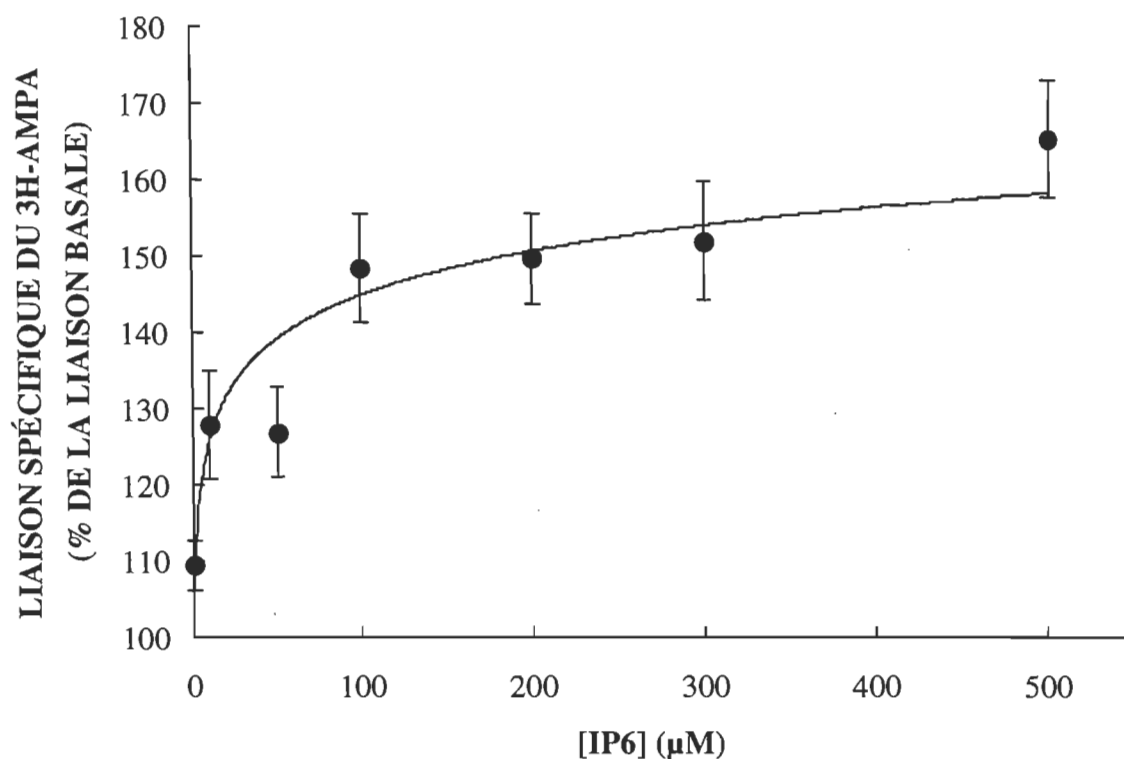
### 3.7 EFFET DE L'IP6, DE L'HÉPARINE ET DE L'ÉLASTASE SUR LA RÉGULATION DE LA LIAISON DU RÉCEPTEUR AMPA PAR L'IP6

Compte tenu du fait que l'IP6 se voit capable d'interférer avec l'action endocytaire de l'adaptine, deux composés, l'héparine et l'élastase, reconnus pour interagir avec cette protéine, furent testés afin de caractériser les mécanismes moléculaires assurant la modulation du récepteur AMPA par l'IP6. Par exemple, on

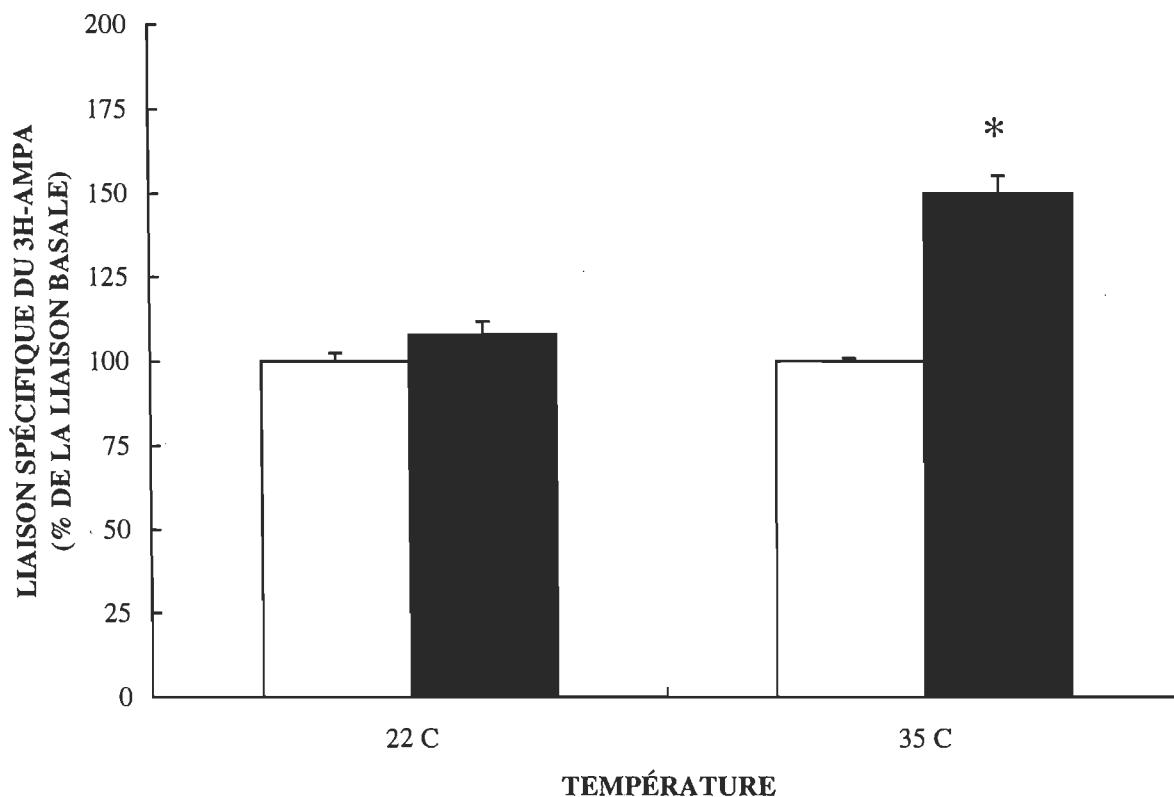
observe que la modulation de la hausse du récepteur AMPA par l'IP6 ( $52 \pm 6.9\%$ ) se voit grandement altérée par la présence de 2 U d'héparine dans le milieu d'incubation ( $6.5 \pm 5.1\%$ ). Des résultats similaires ont été obtenus en présence d'élastase. En fait, l'augmentation de la liaison au récepteur AMPA induit par l'IP6 n'est que de  $3 \pm 10.2\%$  en présence d'élastase (**Fig. 22**). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 6 expériences.

### **3.8 EFFET DE L'HÉPARINE SUR LA MODULATION DE LA SOUS-UNITÉ GLUR1 DU RÉCEPTEUR AMPA PAR L'IP6**

Des coupes de cerveaux de rats d'une épaisseur de 30  $\mu\text{m}$  furent incubées pendant 60 min. à 35°C avec ou sans 200  $\mu\text{M}$  d'IP6, avec 2 U/ml d'héparine seulement ou avec de l'héparine et de l'IP6. Par la suite, la fraction synaptosomale (P2) fut isolée par centrifugations différentielles. Avec 200  $\mu\text{M}$  d'IP6 seulement, l'immunoréactivité de la sous-unité GluR1 est augmentée de  $27.5 \pm 6.9\%$  par rapport à la situation contrôle. Avec 2 U/ml d'héparine, l'augmentation de l'immunoréactivité se chiffre à  $5.7 \pm 6.1\%$  par rapport au contrôle, tandis qu'avec un mélange d'héparine et d'IP6 l'augmentation est de l'ordre de  $6.5 \pm 5.1\%$  comparativement au contrôle (**Fig. 23**). Nous pouvons donc constater ici que la modulation de la sous-unité GluR1 par l'IP6 est grandement altéré par la présence d'héparine (augmentation de  $6.5 \pm 5.1\%$ ). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 2 animaux différents.



**FIGURE 11.** Effet de différentes concentrations d'IP6 sur la liaison du [ $^3\text{H}$ ]AMPA. Des sections horizontales de cerveaux de rats au niveau des hippocampes furent préincubées 1 h dans un tampon Tris-acétate (T/A) avec des concentrations croissantes d'IP6 (0 à 500  $\mu\text{M}$ ). Les lames furent par la suite rincées dans un T/A à 0°C pour ensuite procéder à l'étude de radioliasion avec le [ $^3\text{H}$ ]AMPA tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les résultats représentent la modulation de la liaison du [ $^3\text{H}$ ]AMPA après un traitement à l'IP6 et sont exprimés en pourcentage de la liaison de base. La liaison de base est déterminée à l'aide des sections préincubées dans le tampon T/A sans IP6. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue chez 5 rats (3 mesures par animal).



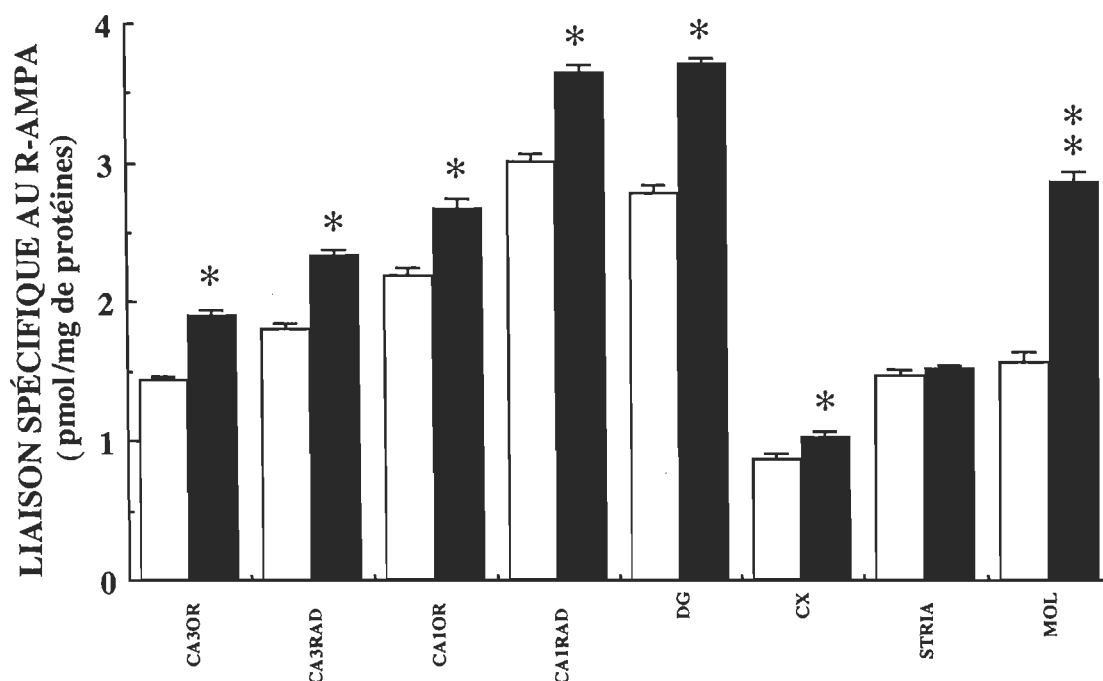
**FIGURE 12.** Effet de la température sur la modulation induite par l'IP6. Des sections horizontales de cerveaux de rats au niveau des hippocampes furent préincubées 1 h dans un tampon T/A à 22°C et à 35°C. Les lames furent par la suite rincées dans un T/A à 0°C pour ensuite procéder à l'étude de radioliation avec le [<sup>3</sup>H]AMPA tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les résultats représentent la modulation de la liaison du [<sup>3</sup>H]AMPA après un traitement avec 200 µM d'IP6 (noir) à 22°C et à 35°C et sont exprimés en pourcentage de la liaison de base. La liaison de base est déterminée à l'aide des sections préincubées dans le tampon T/A sans IP6. Les résultats sont la moyenne ± l'erreur-type obtenue chez 5 rats (3 mesures par animal).



**CONTRÔLE**

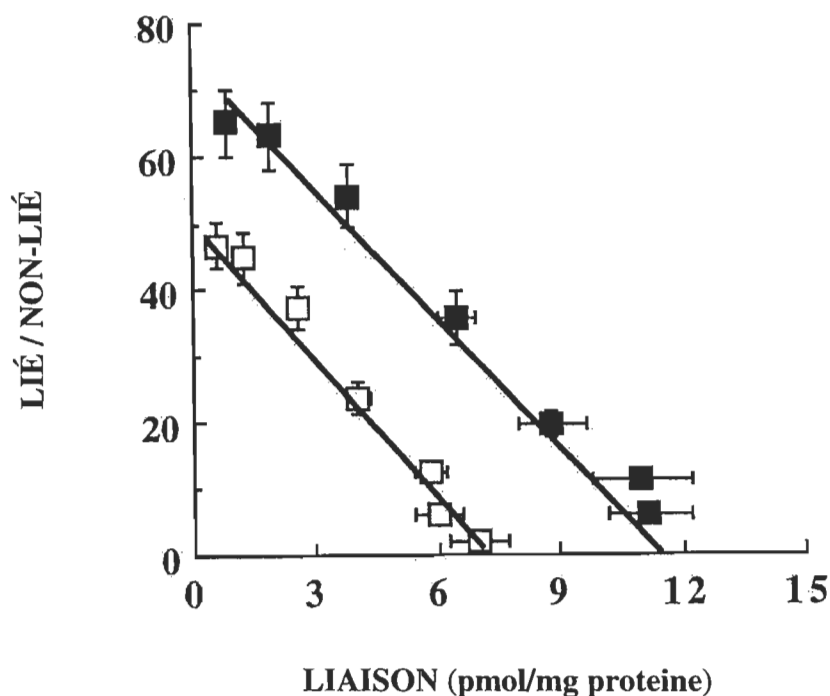
**200  $\mu$ M d'IP6**

**FIGURE 13.** Aspect qualitatif de l'effet de l'IP6 sur la liaison spécifique du [ $^3$ H]AMPA dans les différentes régions cérébrales du rat. Des sections horizontales de cerveaux de rats au niveau des hippocampes furent préincubées 1 h dans un tampon (T/A) avec ou sans 200  $\mu$ M d'IP6.

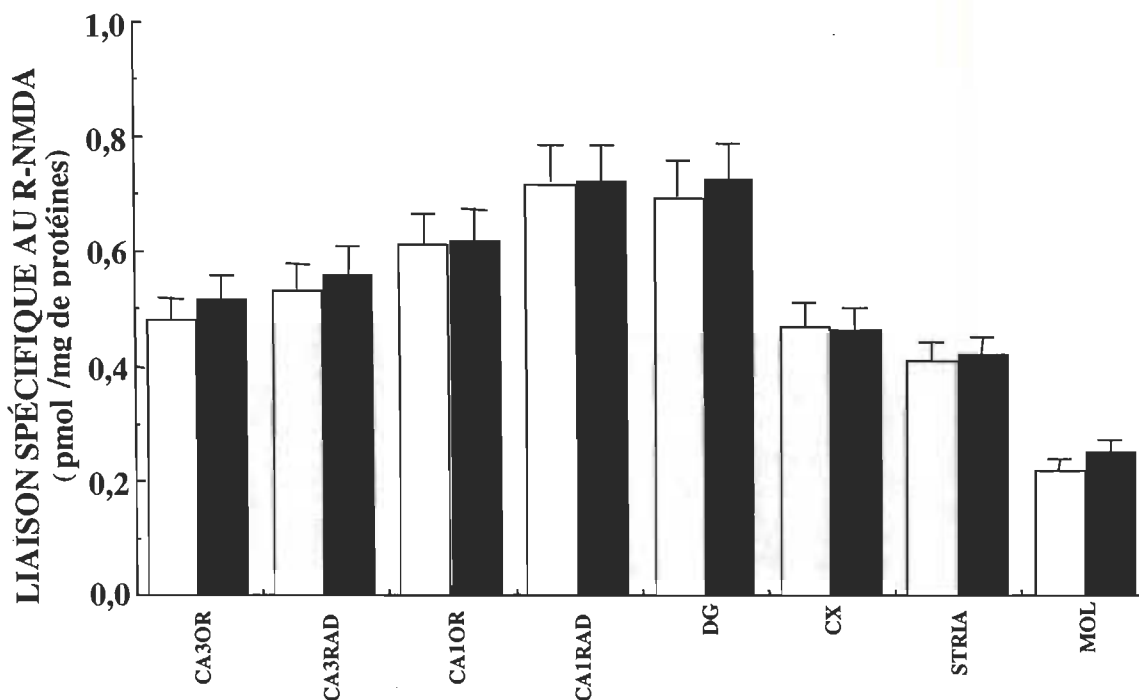


**FIGURE 14.** Effet de l'IP6 sur la liaison spécifique du  $[^3\text{H}]$ AMPA au récepteur AMPA dans différentes régions du cerveau. Des sections horizontales de cerveaux de rats au niveau des hippocampes furent préincubées 1 h dans un tampon (T/A) avec (noir) ou sans (blanc) 200  $\mu\text{M}$  d'IP6. Les autoradiogrammes furent analysés avec un système d'analyse d'images. Différentes régions de l'hippocampe (OR, stratum Oriens; RAD, stratum radiatum; DG, couche moléculaire du gyrus dentatus), le cortex pariéto-temporal (CX), le striatum (STRIA) et le cervelet moléculaire (MOL) furent analysées. Les résultats obtenus pour les différentes régions sont exprimés en pmol/mg de protéines. Les astérisques indiquent les régions dans lesquelles la hausse de liaison du  $[^3\text{H}]$ AMPA est statistiquement significative.

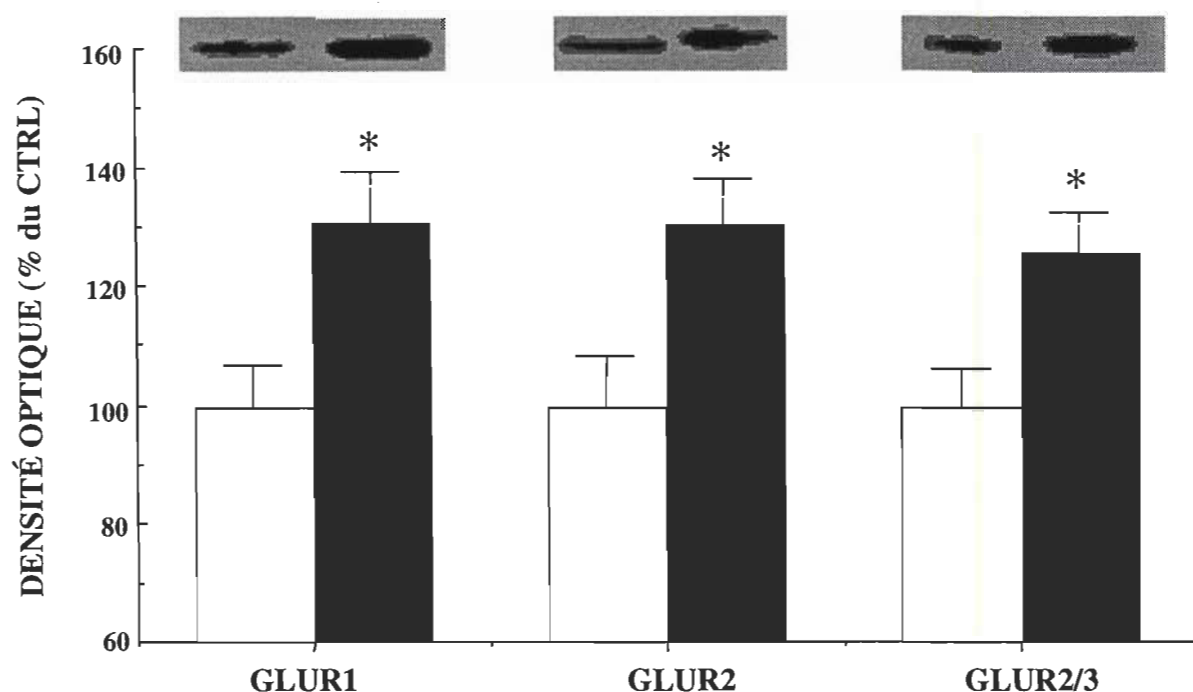




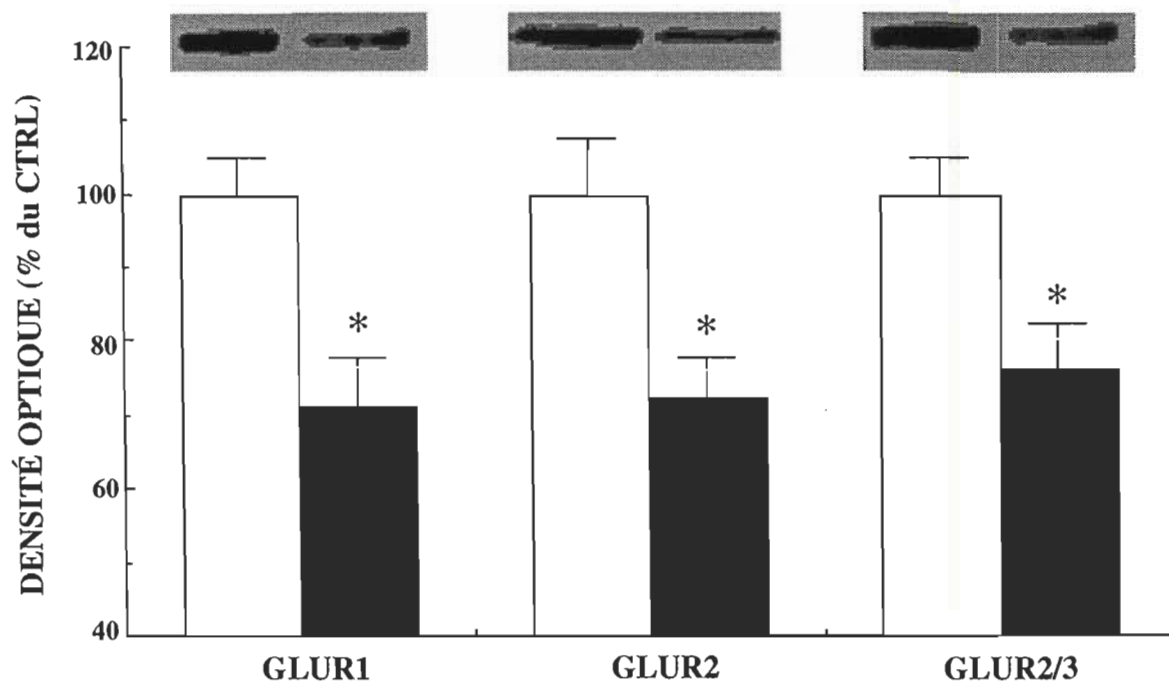
**FIGURE 15.** Effet de l'IP6 sur les propriétés de liaison des récepteurs AMPA dans l'hippocampe. Analyses de Scatchard de la liaison du [ $^3$ H]AMPA dans le stratum radiatum de la région CA<sub>1</sub> hippocampale. Les sections ont été incubées avec (carrés noirs) ou sans (carrés blancs) 200  $\mu$ M d'IP6. La liaison du [ $^3$ H]AMPA a été déterminée en utilisant des concentrations qui varient entre 20 nM et 6  $\mu$ M. Par la suite, eut lieu l'autoradiographie tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les données sont représentées sur un graphique de Scatchard (lié/non-lié, B/F) et ont été analysées par le programme Inplot de GraphPad afin d'obtenir la  $K_D$  et le  $B_{max}$ . Les valeurs de liaison sont une moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue chez 6 rats (4 mesures par animal).



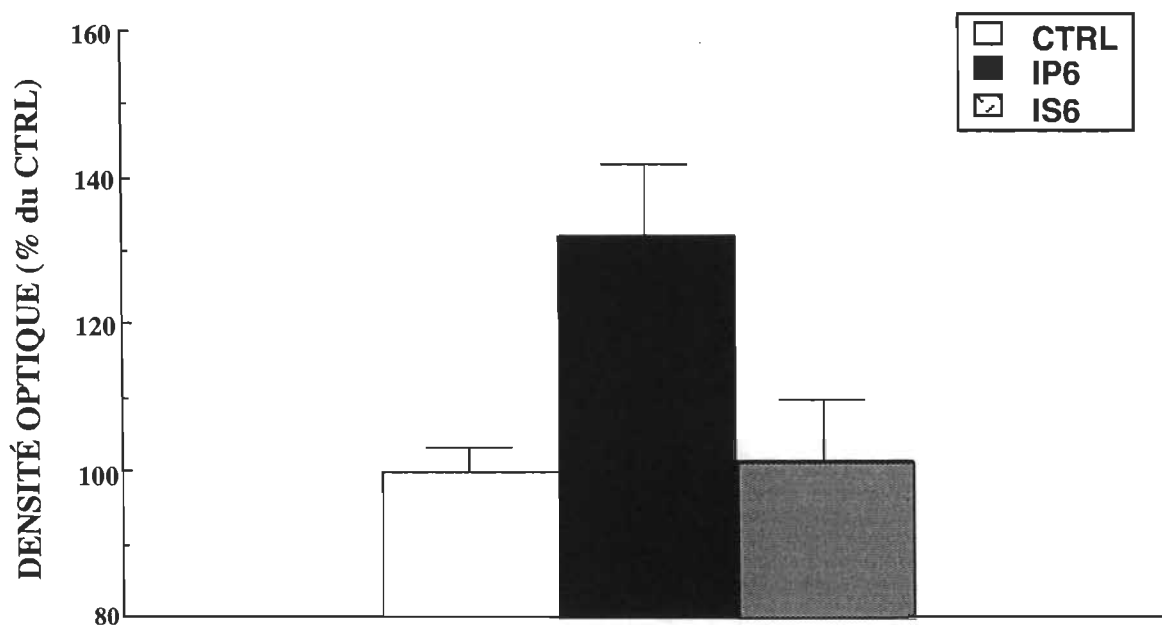
**FIGURE 16.** Effet de l'IP6 sur la liaison spécifique du [ $^3\text{H}$ ]GLUTAMATE au récepteur NMDA dans différentes régions du cerveau. Des sections horizontales de cerveaux de rats au niveau des hippocampes furent préincubées 1 h dans un tampon (T/A) avec (noir) ou sans (blanc) 200  $\mu\text{M}$  d'IP6. Différentes régions de l'hippocampe (OR, stratum Oriens; RAD, stratum radiatum; DG, couche moléculaire du gyrus dentatus), le cortex pariéto-temporal (CX), le striatum (STRIA) et le cervelet moléculaire (MOL) furent analysées. Les résultats obtenus pour les différentes régions sont exprimés en pmol/mg de protéines.



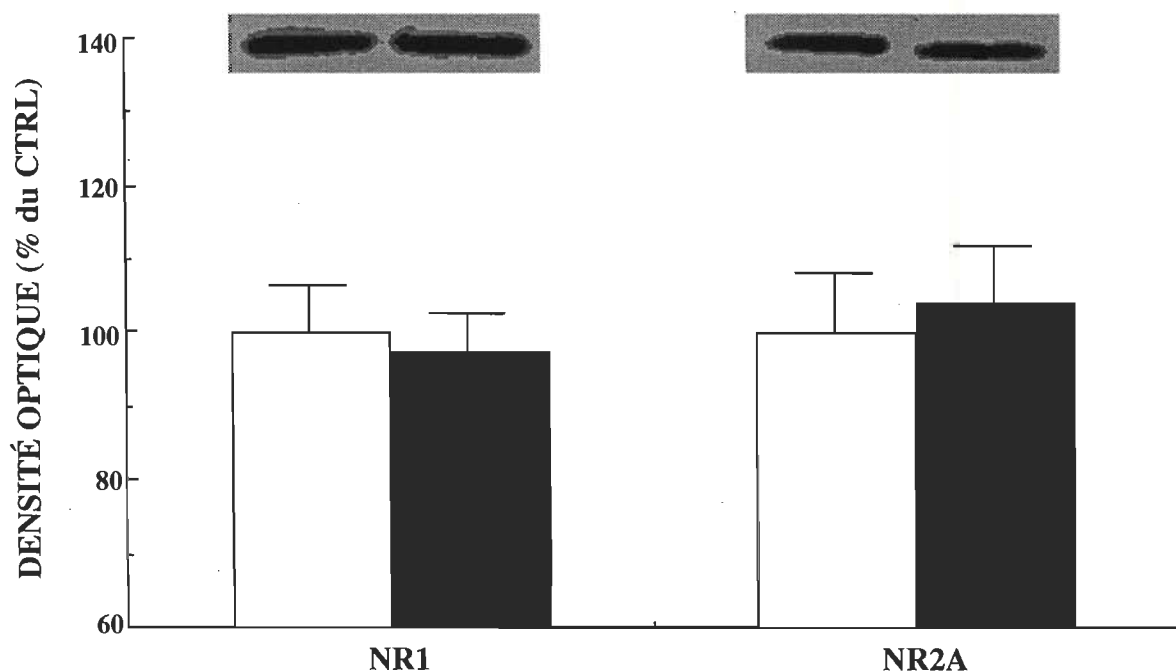
**FIGURE 17.** Aspects qualitatif et quantitatif de l'effet de l'IP6 sur l'immunoréactivité de la fraction synaptosomale (P2) des différentes sous-unités du récepteur AMPA. Des coupes de cerveaux de rats furent préincubées en l'absence (CTRL) (blanc) ou en présence de 200  $\mu$ M d'IP6 (noir). Les bandes des Western blot furent par la suite analysées avec un système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en pourcentage et obtenus par comparaison aux valeurs contrôles. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue par 2 expériences conduites chacune chez 4 animaux différents.



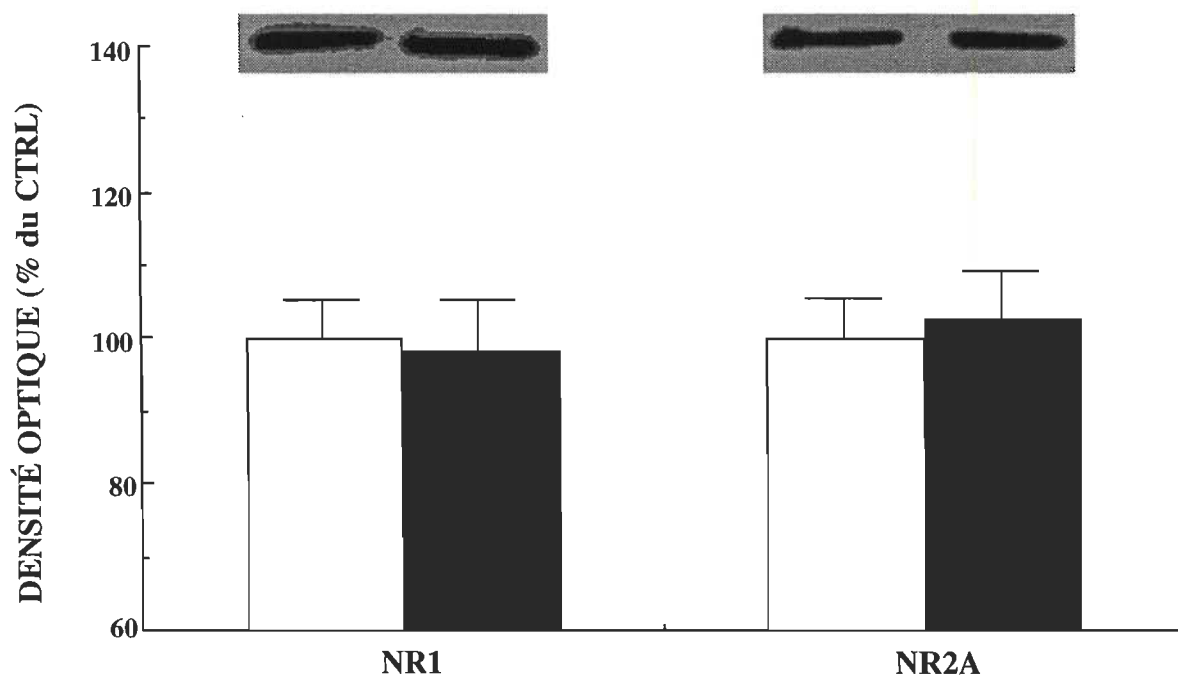
**FIGURE 18.** Aspects qualitatif et quantitatif de l'effet de l'IP6 sur l'immunoréactivité de la fraction microsomale (P3) des différentes sous-unités du récepteur AMPA. Des coupes de cerveaux de rats furent préincubées en l'absence (CTRL) (blanc) ou en présence de 200  $\mu$ M d'IP6 (noir). Les bandes des Western blot furent par la suite analysées avec un système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en pourcentage et obtenus par comparaison aux contrôles. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue par 2 expériences conduites chacune chez 4 animaux différents



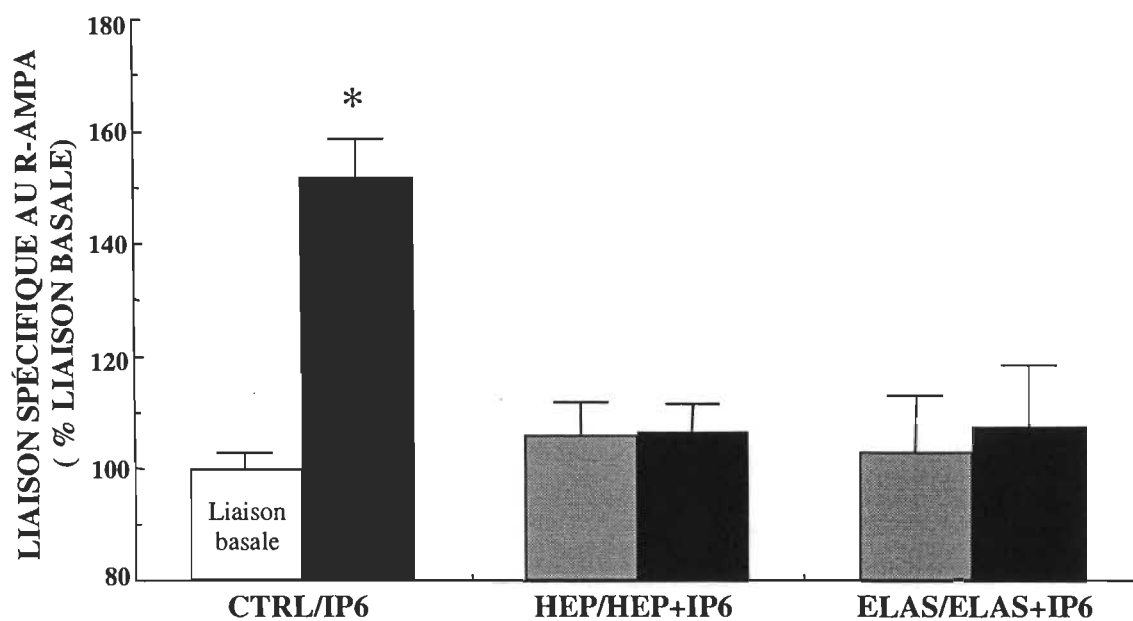
**FIGURE 19.** Effet de l'IS6 sur la fraction synaptosomale (P2) de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA. Des coupes de cerveaux de rats d'une épaisseur de 30  $\mu$ m furent incubées pendant 60 min. à 35°C avec ou sans 200  $\mu$ M d'IP6, de même qu'avec 200  $\mu$ M d'IS6. Ensuite, la fraction synaptosomale (P2) fut isolée par centrifugations différentielles. Les bandes des Western blot furent par la suite analysées avec un système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en pourcentage et sont obtenus par comparaison entre les valeurs contrôles et celles obtenues suite au traitement à l'IP6 ou à l'IS6. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 2 animaux différents.



**FIGURE 20.** Aspects qualitatif et quantitatif de l'effet de l'IP6 sur l'immunoréactivité de la fraction synaptosomale (P2) des différentes sous-unités du récepteur NMDA. Des coupes de cerveaux de rats furent préincubées en l'absence (CTRL) (blanc) ou en présence de 200  $\mu$ M d'IP6 (noir). Les bandes des Western blot furent par la suite analysées avec un système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en pourcentage et obtenus par comparaison aux valeurs contrôles. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue par 2 expériences conduites chacune chez 4 animaux différents.

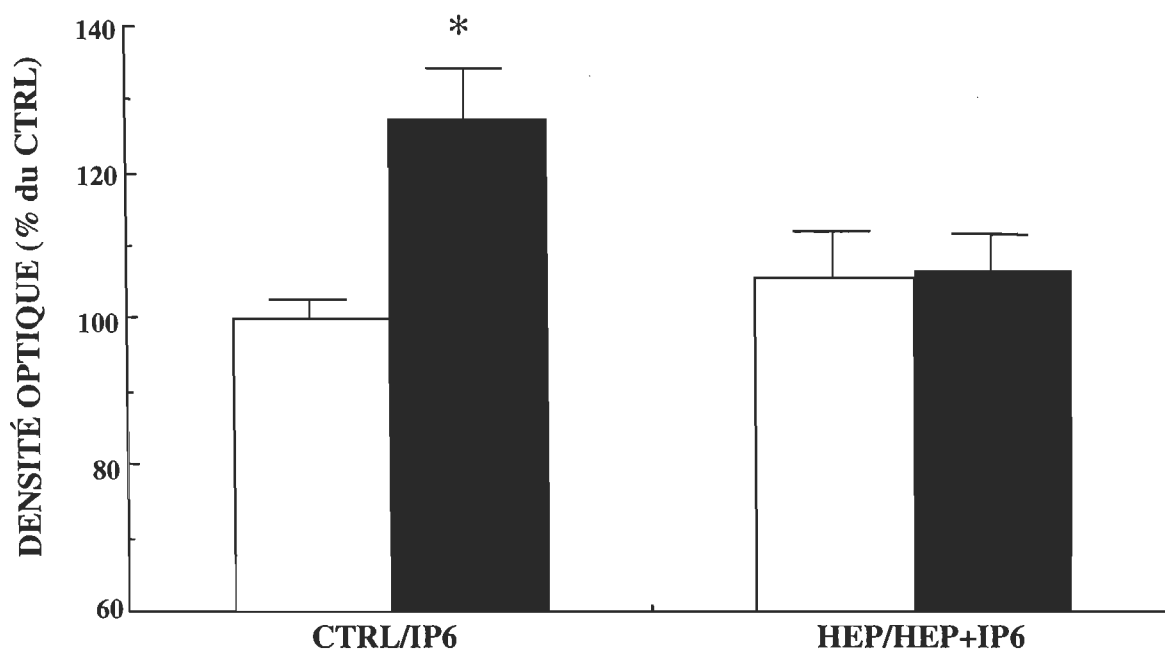


**FIGURE 21.** Aspects qualitatif et quantitatif de l'effet de l'IP6 sur l'immunoréactivité de la fraction microsomale (P3) des différentes sous-unités du récepteur NMDA. Des coupes de cerveaux de rats furent préincubées en l'absence (CTRL) (blanc) ou en présence de 200  $\mu$ M d'IP6 (noir). Les bandes des Western blot furent par la suite analysées avec un système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en pourcentage et obtenus par comparaison aux valeurs contrôles. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type obtenue par 2 expériences conduites chacune chez 4 animaux différents.



**FIGURE 22.** Effet de l'IP6, de l'héparine et de l'élastase sur la liaison spécifique du [ $^3$ H]AMPA au récepteur AMPA. Des lames furent préincubées avec ou sans 200  $\mu$ M d'IP6, avec 2 U/ml d'héparine seulement ou avec de l'héparine et de l'IP6 de même qu'avec de l'élastase ou avec de l'élastase et de l'IP6. La liaison spécifique du [ $^3$ H]AMPA fut ensuite déterminée par étude globale de frottis.





**FIGURE 23.** Effet de l'héparine sur la fraction synaptosomale (P2) de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA. Des coupes de cerveaux de rats d'une épaisseur de 30  $\mu\text{m}$  furent incubées pendant 60 min. à 35°C avec ou sans 200  $\mu\text{M}$  d'IP6, avec 2 U/ml d'héparine seulement ou avec de l'héparine et de l'IP6. Ensuite, la fraction synaptosomale (P2) fut isolée par centrifugations différentielles. Les bandes des Western blot furent par la suite analysées avec un système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en pourcentage et sont obtenus par comparaison entre les valeurs contrôles et celles obtenues suite au traitement à l'IP6 et/ou à l'héparine. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 expériences chacune conduite sur 2 animaux différents.

# CHAPITRE 4

## DISCUSSION

Dans le cadre de la présente étude, l'effet de l'IP6 sur les propriétés biochimiques de deux récepteurs au glutamate, soit les récepteurs AMPA et NMDA, fut évalué. Pour ce faire, la technique d'immunobuvardage (Western Blot), de même que différents radioligands pour l'autoradiographie quantitative, le  $^3\text{H}$ -AMPA et le  $^3\text{H}$ -glutamate, qui sont respectivement deux agonistes des récepteurs AMPA et NMDA, furent utilisés. Les résultats obtenus démontrent une augmentation de la liaison spécifique du [ $^3\text{H}$ ]-AMPA sur des coupes minces de cerveaux de rats suivant le traitement à l'IP6. De plus, il fut constaté que le traitement de coupes minces de cerveaux de rats avec 200  $\mu\text{M}$  d'inositol hexakisphosphate (IP6) induit des changements d'immunoréactivité pour différentes sous-unités du récepteur AMPA. De façon plus précise, une hausse d'environ 30% de l'immunoréactivité est observée sur la fraction P2 (synaptique), et ce, pour les sous-unités GluR1, GluR2 et GluR2/3 du récepteur glutamatergique de type AMPA.

Une première interrogation soulevée par cette étude concerne la pertinence des effets physiologiques observés. En d'autres mots, peut-on imaginer que les hausses d'immunoréactivité et de liaison au récepteur AMPA puissent être uniquement attribuables à des effets de charges, l'IP6 étant une molécule chimiquement très chargée. Or, l'absence d'effet de l'IS6 sur le récepteur AMPA semble appuyer l'idée d'une régulation des récepteurs indépendante d'un effet de charge. L'importance physiologique de la modulation du récepteur AMPA par l'IP6 est d'autre part confirmée par l'absence d'effet à la température de la pièce (22°C).

Les mesures quantitatives effectuées dans le cadre de la présente étude ont révélé des changements des récepteurs AMPA par l'IP6 qui varient d'une région cérébrale à

l'autre. En effet, l'incubation des coupes minces de cerveaux de rat avec de l'IP6 à 35°C génère des hausses de liaisons importantes du [ $^3\text{H}$ ]-AMPA dans les différentes régions de l'hippocampe ainsi que dans le cervelet moléculaire, alors que les autres régions du cerveau sont peu affectées par ce même traitement. Cette observation n'est pas étonnante compte tenu que la liaison maximale de l'IP6 se retrouve dans ces régions d'intérêt. Fait intéressant, ces résultats sont tout à fait cohérents avec la distribution de la liaison du [ $^3\text{H}$ ]-IP6 dans les différentes régions du cerveau de l'animal (Parent et coll., 1994). En effet, Hawkins et ses collaborateurs ont démontré, en 1990, que l'hippocampe et le cervelet du rat sont deux structures anatomiques qui possèdent une étonnante capacité à lier le [ $^3\text{H}$ ]-IP6. À la lumière des résultats obtenus nous pouvons donc proposer que les récepteurs AMPA pour ces régions sont sous une plus grande influence de l'adaptine et que l'interaction avec l'adaptine est plus influente dans ces régions.

Sur le plan mécanistique, nos études de saturation à l'équilibre révèlent que l'effet de l'IP6 est avant tout le résultat d'une augmentation du nombre de sites de liaison du récepteur AMPA. Tel que mentionné précédemment, plusieurs groupes de chercheurs ont démontré la présence de deux populations cellulaires de récepteurs AMPA. On retrouve les récepteurs AMPA membranaires (fraction P2) et les récepteurs AMPA sous-membranaires, appelés microsomaux (fraction P3) (Henley, 1995). Or, nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle une hausse du nombre de récepteurs AMPA au niveau de la membrane neuronale se répercute par une diminution du nombre de ces récepteurs dans la fraction cytosolique. Pour vérifier celle-ci, l'effet de l'IP6 sur l'immunoréactivité des sous-unités GluR1, GluR2 et GluR2/3 du récepteur AMPA présent dans la fraction P3 d'une préparation de membranes synaptiques fut évalué. En accord avec la hausse d'immunoréactivité notée dans la partie synaptosomale (P2), une diminution de l'immunoréactivité dans la partie microsomale (P3) est effectivement observée, et ce, pour les mêmes sous-unités GluR1, GluR2 et GluR2/3 du récepteur AMPA. Cette baisse d'immunoréaction, observée dans la fraction P3, permet de proposer qu'un traitement des coupes minces de cerveaux de rats induit une diminution du nombre de récepteurs AMPA dans la partie microsomale du neurone après le

traitement à l'IP6. Dans cette perspective, les résultats obtenus montrent que l'IP6 intervient donc dans les processus cellulaires responsables de réguler la distribution différentielle des deux populations de récepteurs AMPA.

La présente étude met également en évidence l'action sélective de l'IP6 sur le récepteur AMPA. En effet, le traitement de coupes minces de cerveaux de rats par l'IP6 ne provoque aucun changement significatif de l'immunoréactivité dans les fractions synaptosomale (P2) et microsomale (P3), et ce, pour les sous-unités NR1 et NR2A du récepteur NMDA. Ces résultats sont d'ailleurs appuyés par nos études de liaison. De façon évidente, les données scientifiques obtenues, tendent donc à démontrer que l'IP6 interfère de façon spécifique sur les différents compartiments synaptosomal et microsomal des récepteurs AMPA, en contribuant à augmenter leur nombre au niveau de la membrane synaptique. Cette spécificité réactionnelle liée à l'effet de l'IP6 sur les récepteurs AMPA n'est guère surprenante. En effet, les résultats obtenus sont soutenus par plusieurs études montrant que des manipulations biochimiques et/ou physiologiques perturbent spécifiquement le récepteur AMPA alors que le récepteur NMDA n'est pas touché par des traitements similaires. Par exemple, le traitement de coupes minces de cerveaux de rats par le calcium, certaines phospholipases, la calpaïne et la phosphatidylsérine augmentent spécifiquement la liaison du [<sup>3</sup>H]-AMPA dans l'hippocampe sans changer celle du récepteur NMDA (Gagné et coll., 1996; Tocco et coll., 1992; Massicotte et coll., 1991; Massicotte et coll., 1990; Massicotte et Baudry 1990). De façon intéressante, il a récemment été proposé qu'une modification fonctionnelle du nombre de récepteurs AMPA au niveau de la membrane postsynaptique serait important dans le contrôle de la fonction de cette dernière (Malenka et Nicoll, 1999; Malinow, 1998), proposition appuyée par plusieurs publications scientifiques (Lissin et coll., 1999; O'Brien et coll., 1998; Wan et coll., 1997; Durand et coll., 1996; Liao et coll., 1995; Isaac et coll., 1995; Kullmann, 1994). À titre d'exemple, il a été établi qu'une stimulation de l'activité des neurones provoque une redistribution des récepteurs AMPA au niveau de la membrane synaptique (Caroll et coll., 1999b; Lissin et coll., 1999; Lissin et coll., 1998). Cependant, les mécanismes cellulaires par lesquels

l'IP6 entraîne une modification du nombre de récepteurs AMPA membranaires demeurent obscurs.

Tel que mentionné dans l'introduction, l'IP6 est principalement formé suivant une stimulation des récepteurs au glutamate de type métabotrope. De plus, il est bien connu que l'IP6 possède un site de liaison de haute affinité sur la protéine AP-2, laquelle s'avère indispensable à l'internalisation des récepteurs membranaires (Voglmaier et coll., 1992). En fait, l'endocytose des récepteurs est généralement rendue possible grâce à la formation de vésicules tapissées de clathrine. Cette protéine ubiquitaire qu'est la clathrine nécessite l'action de la protéine AP-2 pour permettre son assemblage en un complexe réseau hexagonal, cet assemblage étant nécessaire à l'invagination des récepteurs membranaires vers l'intérieur de la cellule. De façon plus précise, le puits de clathrine permettrait l'internalisation des récepteurs suivant une hydrolyse du GTP par la dynamine GTPase (Carrol et coll., 1999a; Koenig et Ikeda, 1989). Par conséquent, une inhibition de l'interaction de l'AP-2 avec la clathrine entraînera un dysfonctionnement de l'endocytose des récepteurs membranaires. Fait intéressant, il est reconnu que la liaison de l'IP6 sur l'AP-2 empêche cette dernière d'interagir avec la clathrine afin de promouvoir son assemblage et d'induire l'endocytose du récepteur (Sasakawa et coll., 1995).

De plus, il a récemment été démontré que la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA co-immunoprécipite avec l'AP-2 (Ju et coll., 1999), laissant ainsi croire que le récepteur AMPA pourrait être internalisé par des processus cellulaires dépendants de la clathrine (Man et coll., 2000). En accord avec cette hypothèse, de récents résultats montrent que les récepteurs intracellulaires de type AMPA sont étroitement associés à une protéine intrinsèque des vésicules tapissées de clathrine nommée EPS 15. Dans la présente étude, on constate que l'IP6 est en mesure d'altérer la distribution des différentes sous-unités du récepteur AMPA dans les fractions synaptique et microsomale. Par ailleurs, les résultats obtenus démontrent que la présence d'héparine ou d'élastase s'oppose aux effets de l'IP6 sur les récepteurs AMPA. Comme il a été

démontré que ces deux composés empêchent l'interaction de l'IP6 avec l'AP-2 (Peeler et coll., 1993; Amende et coll., 1987), nos résultats appuient fortement l'idée que l'IP6 soit en mesure d'interférer avec les processus d'endocytose tributaires de la clathrine. Évidemment les résultats obtenus par l'héparine et l'élastase sont plutôt indirects et on ne peut exclure pour l'instant la possibilité d'action de ces substances sur le récepteur. Dans ce contexte, il serait important de confirmer par des études de microscopie confocale les effets de l'IP6 sur l'interaction potentielle de l'AP-2 avec le récepteur AMPA.

## CONCLUSION

Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent que l'IP6 entraîne une augmentation du nombre de récepteurs AMPA au niveau de la membrane neuronale en inhibant l'endocytose de ce récepteur. Évidemment l'importance physiologique de cette modulation reste à définir. Cependant plusieurs études tendent à démontrer qu'une régulation du nombre de récepteurs AMPA permettrait aux neurones d'adapter leurs fonctions et leurs réponses suite à différents stimuli (Man et coll., 2000; Turrigiano, 2000; Shi et coll., 1999; Lledo et coll., 1998; Maren et coll., 1993). La LTP, une forme électrophysiologique de plasticité neuronale, est actuellement l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour l'exploration des propriétés physiologiques de la mémoire. Sans entrer dans les détails, mentionnons que la LTP constitue un renforcement durable de la communication entre deux neurones suite à une activité électrique intense dans divers circuits neuronaux. Or, pour la majorité des experts, c'est vraisemblablement l'altération des récepteurs postsynaptiques de type AMPA qui assurerait le maintien de la LTP, et ce, du moins dans la région CA1 de l'hippocampe. Il a été proposé qu'une stimulation intense des afférences glutamatergiques permettrait de transformer certaines synapses, dites silencieuses, en synapses actives, lesquelles deviendraient alors aptes à répondre efficacement au neurotransmetteur glutamate (Malenka et Nicoll, 1997; Isaac et coll., 1995; Liao et coll., 1995). Ce serait donc l'ajout de nouveaux récepteurs de type AMPA au niveau des synapses silencieuses qui contribuerait à maintenir la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe. Bien sûr des études supplémentaires devront être effectuées afin d'établir la contribution de l'IP6 dans la régulation à la hausse des récepteurs AMPA lors du maintien de la LTP.

Outre des considérations purement physiologiques, il faut savoir que la régulation à la hausse des récepteurs AMPA peut éventuellement contribuer à la mort des neurones notamment lors d'un accident cérébrovasculaire. Fait intéressant, il a été démontré que l'injection d'IP6 dans les cerveaux de rats engendre un effet neurotoxique important et irréversible (Lees et Leong, 1996). D'un point de vue pathologique, un dérèglement dans

la cascade métabolique des inositols qui favoriserait une formation accrue d'IP6 pourrait, en partie, expliquer certains aspects des processus neurodégénératifs. Une concentration anormalement élevée d'IP6 pourrait empêcher l'endocytose des récepteurs AMPA perturbant ainsi la transmission synaptique normale et causant une activité neuronale toxique pour la région cérébrale impliquée. Ici encore, des études seront requises pour élucider le rôle de la régulation des récepteurs AMPA par l'IP6 dans diverses conditions neuropathologiques.



# BIBLIOGRAPHIE

- Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., & Ungewickell, F. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. EMBO J., 1988, 7, 919-929.
- Ahle, S., & Ungewickell, E. Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex. J. Biol. Chem., 1989, 264, 20089-20093.
- Akers, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J., & Routtenberg, A. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. Science, 1986, 231, 587-589.
- Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., & Craig, A.M. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. J. Neurosci., 1998, 18, 2423-2436.
- Amende, L.M., Chernick, S.S., Reed, G.F., & Blanchette-Mackie, E.J. Effect of heparin on membrane associated clathrin basketwork of cultured cells derived from the stromal-vascular fraction of mouse brown adipose tissue. Cell. Biol. Int. Rep., 1987, 11(9), 637-644.
- Aztély, F., & Gustafsson, B. Ionotropic glutamate receptors: their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. Mol. Neurobiol., 1996, 12, 1-11.
- Bahn, S., & Wisden, W. A map of non-NMDA receptor subunit expression in the vertebrate brain derived from in situ hybridization histochemistry, dans Monaghan D.T. et Wenthold R.J. The Ionotropic Glutamate Receptors. 1996, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 149-187.
- Bear, M.F., & Malenka, R.C. Synaptic plasticity : LTP and LTD. Current Opinion in Neurobiology, 1994, 4, 389-399.
- Beck, K.A., Chang, M., Brodsky, F.M., & Keen, J.H. Clathrin assembly protein AP-2 induces aggregation of membrane vesicles: a possible rôle for AP-2 in endosome formation. J. Cell. Biol., 1992, 119, 787-796.
- Beck, K.A., & Keen, J.H. Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. J. Biol. Chem., 1991, 266, 4442-4447.
- Ben-Ari, Y., & Gho, M. Long lasting modification of the synaptic properties of rats CA<sub>3</sub> hippocampal neurons induced by kainate. J. Physiol. (London), 1988, 404, 365-384.

- Bennett, M.V., Pellegrini-Gampietro, D.E., Gorter, J.A., Aronica, E., Connor, J.A., & Zukin, R.S. The GluR2 hypothesis: Ca(++)-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1996, 61, 373-84.
- Bennett, J.A. & Dingledine, R. Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. Neuron, 1995, 14, 373-384.
- Berridge, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem. J., 1984, 220, 345-360.
- Bled, J.D., & Brestcher, M.S. Transferrin receptor and its recycling in Hela cells. EMBO J. 1982, 4, 351-355.
- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., & Heinemann, S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. Science, 1990, 249, 1033-7.
- Branham, C.R., Alkon, D.L., & Lester, D.S. Arachidonic acid and diacylglycerol act synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience, 1994, 3, 737-743.
- Burnashev, N., Monyer, H., Sceburg, P.H., & Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. Neuron, 1992, 8, 189-98.
- Caroll, R.C., Beattie, E.C., Xia, H., Lüscher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., & von Zastrow, M. Dynamin dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999a, 96, 14112-14117.
- Caroll, R.C., Lissin, D.V., von Zastrow, M., Nicoll, R.A., & Malenka, R.C. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. Nature Neuroscience, 1999b, 2, 454-460.
- Chabot, C., Massicotte, G., Milot, M., Trudeau, F., & Gagné, J. Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. Brain Res., 1997, 768, 249-256.
- Chabot, C., Bernard, J., Normandin, M., Ohayon, M., Baudry, M., & Massicotte, G. Developmental changes in depolarization-mediated AMPA receptor modifications and potassium-induced long-term potentiation. Developmental Brain Res., 1996, 93, 70-75.
- Changeux, J.-P., Kasai, M., & Lee, C.Y. The use of snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 67, 1241-1247.

- Choi, D.W. Antagonizing excitotoxicity: A therapeutic strategy for stroke? Mount Sinai J. Med., 1998, 65, 133-138.
- Conn, P.J., & Pin, J.-P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1997, 37, 205-237.
- Coomber, C. A model of associative long-term potentiation and long-term depression in a compartmental reconstruction of a neuron. Neurocomputing, 1997, 16, 189-205.
- Cotman, C.W., Bridges, R.J., Taube, J.S., Clark, A.S., Geddes, J.W., & Monaghan, D.T. The role of NMDA receptor in central nervous system plasticity and pathology. J. NIH Res., 1989, 1, 65-74.
- Cremona, O., & De Camilli, P. Synaptic vesicle endocytosis. Curr. Opin. Neurobiol., 1997, 7, 323-330.
- Das, S., Sasaki, Y.F., Rothe, T., Premkumar, L.S., Takasu, M., Crandall, J.E., Dikkes, P., Conner, D.A., Rayudu, P.V., Cheung, W., Chen, H.-S., Lipton, S.A. & Nakanishi, N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. Nature (London), 1998, 393, 377-381.
- Davies, S.N., Butcher, S.P., & Morris, R.G.M. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphopentane (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. J. Neurosci., 1992, 12, 21-34.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S.F. The glutamate receptor ion channels. Pharmacological Reviews, 1999, 51, 7-61.
- Dingledine, R., McBain, C.J., & McNamara, J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Trends Pharmacol., 1990, 11, 334-338.
- Doble, A. Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. Thérapie, 1995, 50, 319-337.
- Dong, H., O'Brien, R.J., Fung, E.T., Lanahan, A.A., Worley, P.F., & Huganir, R.L. Grip : a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. Nature, 1997, 386, 279-284.
- Durand, G.M., Kovalchuk, Y., & Konnerth, A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. Nature, 1996, 381, 71-75.
- During, M.J., Symes, C.W., Lawlor, P.A., Lin, J., Dunning, J., Fitzsimons, H.L., Poulsen, D., Leone, P., Xu, R., Dicker, B.L., Lipski, J., & Young, D. An oral

- vaccine against NMDR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. Science, 2000, 25, 1453-1460.
- Elliott, T.R. On the action of adrenalin. J. Physiol. (Lond.), 1904, 31, 20P.
- Farooqui, A.A., & Horrocks, L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. Brain Res. Rev., 1991, 16, 171-191.
- Farooqui, A.A., Farooqui, T., Yates, A.J., & Horrocks, L.A. Regulation of protein kinase C activity by various lipids. Neurochem. Res., 1988, 13, 499-511.
- Foster, T.C., Gagné, J., & Massicotte, G. Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. Brain Res., 1996, 736, 243-50.
- Fukuda, M., & Mikoshiba, K. The function of inositol high polyphosphate binding proteins. BioEssays, 1997, 19, 593-603.
- Fukuda, M., Aruga, J., Niiobe, M., Aimoto, S., & Mikoshiba, K. Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II. J. Biol. Chem., 1994, 169, 29206-29211.
- Gagné, J., Gélinas, S., Martinoli, M.-G., Foster, T.C., Ohayon, M., Thompson, R.F., Baudry, M., & Massicotte, G. AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. Brain Res. 1998, 799, 16-25.
- Gagné, J., Milot, M., Gélinas, S., Lahsaïni, A., Trudeau, F., Martinoli, M.-G., & Massicotte, G. Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats. Diabetes, 1997, 46, 841-846.
- Gagné, J., Giguère, C., Tocco, G., Ohayon, M., Thompson, R.F., Baudry, M., & Massicotte, G. Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats. Brain Res., 1996, 740, 337-345.
- Gordon, P., Carpentier, J.M., Cohen, S., & Orci, L. Epidermal growth factor morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 5025-5029.
- Graf, E., Empson, K.L., & Eaton J.W. Phytic acid. A natural antioxydant. J. Biol. Chem., 1987, 262, 11647-11650.
- Haigler, H.T., McKanna, J.A., & Cohen, S. Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells a-431 by epidermal growth factor. J. Cell. Biol., 1979, 83, 82-90.

- Hawkins, L.M., Beaver, K.M., Jane, D.E., Taylor, P.M., Sunter, D.C., & Robert, P.J. Characterization of the pharmacology and regional distribution of (S)-[3H]-5-fluorowillardiine binding in rat brain. Brit. J. Pharmacol., 1995, 116, 2033-2039.
- Hawkins, P.T., Poyner, D.R., Jackson, T.R., Letcher, A.J., Lander, D.A., & Irvine R.F. Inhibition of iron-catalyzed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for *myo*-inositol hexakisphosphate. Biochem. J., 1993, 294, 929-934.
- Hawkins, P.T., Reynolds, D.J.M., Poyner, D.R. & Hanley, M.R. Identification of a Novel Inositol Phosphate Recognition Site: Specific  $[^3\text{H}]\text{IP}_6$  Binding to Brain Regions and Cerebellar Membranes. Biochem. Biophys. Res. Commu., 1990, 167, 819-827.
- Henley, J.M. Subcellular localization and molecular pharmacology of distinct populations of  $[^3\text{H}]\text{-AMPA}$  binding sites in rat hippocampus. British Journal of Pharmacology, 1995, 115, 295-301.
- Heslop, J.P., Irvine, R.F. Tashjian, J.A.H., & Berridge, M.J. Inositol tetrakis- and pentakisphosphate in GH<sub>4</sub> cells. J. Exp. Biol., 1985, 119, 195-401.
- Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S.W. & Heinemann, S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. Nature (London), 1989, 342, 643-648.
- Hollmann, M., Maron, C., & Heinemann, S. N-Glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. Neuron, 1994, 13, 1331-1343.
- Hughes, P., & Michell, R. Novel inositol containing phospholipids and phosphates: their synthesis and possible new roles in cellular signaling. Current Opinion in Neurobiology, 1993, 3, 383-400.
- Hume, R.I., Dingledine, R., & Heinemann, S.F. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. Science, 1991, 253, 1028-31.
- Iino, M., Ozawa, S., & Tsuzuki, K. Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. J. Physiol., 1990, 424, 151-65.
- Insel, T.R., Miller, L.P., & Gelhard, R.E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. Neurosci., 1990, 35, 31-43.

- Isaac, J.T.R., Nicoll, R.A., & Malenka, R.C. Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. Neuron, 1995, 15, 427-434.
- Jackson, T.R., Hallam, T.J., Downes, C.P., & Hanley, M.R. Receptor coupled events in bradykinin action: rapid production of inositol phosphates and regulation of cytosolic free  $\text{Ca}^{++}$  in neural cell line. EMBO J., 1987, 6, 49-54.
- Johnson, J.W., & Ascher, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature, 1987, 325, 529-531.
- Kamiguchi, H., Long, K.E., Pendergast, M., Schaefer, A., Rapoport, I., Kirchhausen, T., & Lemmon, V. The neural adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. J. Neurosci., 1998, 14, 5311-5321.
- Keen, J.H., Beck, K.A., Kirchhausen, T., & Jarrett, T. Clathrin domains involved in recognition by assembly protein AP-2. J. Biol. Chem., 1991, 266, 7950-7956.
- Keen, J.H., & Beck, K.A. Identification of the clathrin-binding domain of assembly protein AP-2. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 158, 17-23.
- Keen, J.H. Clathrin assembly proteins: affinity purification and a model for coat assembly. J. Cell. Biol., 1987, 105, 1989-1998.
- Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., & Seeburg, P.H. A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science, 1990, 249, 556-60.
- Kirchhausen, T., & Harrison, S.C. Protein organization in clathrin trimers. Cell, 1981, 23, 755-761.
- Kittler, J.T., Delmas, P., Jovanovic, J.N., Brown, D.A., Smart, T.G., & Moss, S.J. Constitutive endocytosis of GABA A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. J. Neurosci., 2000, 21, 7972-7.
- Koenig, J.H., & Ikeda K. Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockade of membrane retrieval. J. Neurosci., 1989, 9, 3844-3860.
- Krzywkowski, P., Ghribi, O., Gagné, J., Chabot, C., Kar, S., Rochford, J., Massicotte, G., & Poirier, J. Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice. Neuroscience, 1999, 92, 1273-1286.

- Langley J.N. On nerve-endings and on special excitable substances in cells. Proc. Roy. Soc. B., 1906, 78, 170-94.
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., & Kuhse, J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. Neuron, 1997, 18, 493-503.
- Lees, G.J., & Leong, W. Neuronal cytotoxicity of inositol hexakisphosphate (phytate) in the rat hippocampus. Brain Res, 1996, 741, 134-41.
- Leonard, A.S., Davare, M.A., Horne, M.C., Garner, C.C., & Hell, J.W. SAP97 is associated with the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. J. Biol. Chem., 1998, 273, 19518-19524.
- Lerma, J., Morales, M., Vicente, M.A., & Herreras, O. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. TINS, 1997, 20, 9-12.
- Liao, D., Hessler, N.A., & Malinow, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. Nature, 1995, 375, 400-404.
- Lin, H.C., Moore, M.S., Sanan, D.A., & Anderson, R.G. Reconstitution of clathrin-coated pit budding from plasma membranes. J. Cell. Biol., 1991, 114, 881-891.
- Lissin, D.V., Carroll, R.C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., & von Zastrow, M. Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. J. Neuroscience, 1999, 19, 1263-1272.
- Lissin, D.V., Gomperts, S.N., Carroll, R.C., Christine, C.W., Kalman, D., Kitamura, M., Hardy, S., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., & von Zastrow, M. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 12, 7097-7102.
- Lledo, P.M., Zhang, X., Südhof, T.C., Malenka R.C., & Nicoll, R.A. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. Science, 1998, 279, 399-403.
- Loewi, O., & Navratil, E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, VI : Der Angriffspunkt des Atropins. Pflügers Arch. Ges. Physiol., 1924, 206, 123-34.
- Loewi, O., & Navratil, E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, X : Über das Schicksal des Vagusstoffes. Pflügers Arch. Ges. Physiol., 1926a, 214, 678-88.
- Loewi, O., & Navratil, E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, XI : Über den Mechanismus der Vaguswirkung Von Physostigmin und Ergotamin. Pflügers Arch. Ges. Physiol., 1926b, 214, 689-96.

- Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. Long-term potentiation-a decade of progress ? Science, 1999, 285, 1870-1874.
- Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. Silent synapses speak up. Neuron, 1997, 19, 473-476.
- Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. Trends Neurosci., 1993, 16, 521-527.
- Malinow, R. Silencing the controversy in LTP ? Neuron, 1998, 21, 1226-1227.
- Maren, S., & Baudry, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. Neurobiol. Learn. Mem., 1995, 63, 1-18.
- Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 : a necessary step in long-term potentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 1893-1897.
- Massicotte, G., & Baudry, M. Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. Neurosci. Lett., 1990, 118, 245-248.
- Man, Y.H., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., & Wang, Y.T. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. Neuron, 2000, 25(3), 649-662.
- Mayer, M.L., & Westbrook, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol.(Lond.), 1987a, 394, 501-27.
- Mayer, M.L., & Westbrook, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. Prog. Neurobiol., 1987b, 28, 197-276.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., & Guthrie, P.B. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature, 1984, 309, 261-263.
- McDonald, J.W., & Johnston, M.V. Physiological and pathological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. Brain Res. Rev., 1990, 15, 41-70.
- Mishina, M., Sakimura, K., Mori, H., Kushiya, E., Harabayashi, M., Uchino, S., & Nagahari, K. A single amino acid residue determines the Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA-selective glutamate receptor channels. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, 180, 813-21.



- Monaghan, D.T., Bridges, R.J., & Cotman, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1989, 29, 365-402.
- Monaghan, D.T., Yao, D., & Cotman, C.W. Distribution of [<sup>3</sup>H]AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. Brain Res., 1984, 324, 160-164.
- Monyer, H., Seeburg, P.H., & Wisden, W. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. Neuron, 1991, 6, 799-810.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, M., & Nakanishi, S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature (London), 1991, 354, 31-37.
- Morris, R.G.M., & Frey, U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 1997, 352, 1489-1503.
- Muller, D., Oliver, M., & Lynch, G. Developmental changes in synaptic properties in hippocampus of neonatal rats. Dev. Brain Res., 1989, 49, 105-114.
- Musleh, W., Bi, X., Tocco, G., Yaghoubi, S., & Baudry, M. Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 9451-9456.
- Murphy, S.N., & Miller, R.J. A glutamate receptor regulates Ca<sup>2+</sup> mobilization in hippocampal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 8737-8741.
- Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science, 1992, 258, 597-603.
- Nakanishi, N., Schneider, N.A., & Axel, R. A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. Neuron, 1990, 5, 569-581.
- Nielsen, E.O., Drejer, J., Cha, J.H., Young, A.B., & Honore, T. Autoradiographic characterization and localization of quisqualate binding sites in rat brain using the antagonist [3H]6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione: comparison with (R,S)-[3H] $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid binding sites. J. Neurochem., 1990, 54, 686-95.

- Noel, J., Ralph, G.S., Pickard, L., Williams, J., Molnar, E., Uney, J.B., Collingridge, G.L., & Henley, J.M. Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. Neuron, 1999, 23, 365-376.
- O'Brien, R.J., Kamboj, S., Ehlers, M.D., Rosen, K.R., Fishbach, G.D., & Huganir, R.L. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. Neuron, 1998, 21, 1067-1078.
- Olney, J.W. Neurotoxicity of excitatory amino acids. Dans McGeer, E.G., Olney, J.W., & McGeer, P.L. Kainic acid as a tool in neurobiology. 1978, Raven Press, New York, pp. : 95-112.
- Olsen, R.W., Szamraj, O., & Houser, C.R. [<sup>3</sup>H]AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. Brain Res., 1987, 402, 243-54.
- Osten, P., Srivastava, S., Inman, G.J., Vilim, F.S., Khatri, L., Lee, L.M., States, B.A., Einheber, S., Milner, T.A., Hanson, P.I., & Ziff, E.B. The AMPA receptor GluR2 C-terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with nsf and □□and □-SNAPS. Neuron, 1998, 21, 99-110.
- Ozawa, S., Haruyuki, K., & Keisuke, T. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog. Neurobiol., 1998, 54, 581-618.
- Palade, G.E., & Palay, S.L. Electron microscopy observations of interneuronal and neuromuscular synapses. Anat. Rec., 1954, 118, 3-35.
- Parent, A., Poirier, J., Baccichet, A., & Quirion, R. Regulation of 1,4,5-IP<sub>3</sub>, 1,3,4,5-IP<sub>4</sub> and IP<sub>6</sub> binding sites following entorhinal cortex lesions in rat brains. Neuroscience, 1994, 61, 565-73.
- Peeler, J.S., Donzell, W.C., & Anderson, R.G. The appendage domain of the AP-2 subunit is not required for assembly or invagination of clathrin-coated pits. J. Cell. Biol., 1993, 120(1), 47-54.
- Pearse, B.M.F., & Robinson, M.S. Purification and properties of 100 kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. EMBO J., 1984, 3, 1951-1957.
- Pelligrini-Giampietro, D.E., Bennett, M.V.L., & Zukin, R.S. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an *in situ* hybridization study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 4157-4161.

- Petralia, R.S., & Wenthold, R.J. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. J. Comp. Neurol., 1992, 318, 329-54.
- Pittet, D., Schlegel, W., Lew, D.P., Monod, A., & Mayr G.W. Mass changes in inositol tetrakis- and pentakisphosphate isomers induced chemotatic peptide stimulation in HL-60 cells. J. Biol. Chem., 1989, 264, 18489-18493.
- Poodry, C.A. Shibine, a neurogenic mutant of Drosophila. Dev. Biol., 1990, 138, 464-472.
- Robinson, M.S. 100 kD coated vesicle proteins : molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. J. Cell. Biol., 1987, 104, 887-895.
- Sasakawa, N., Sharif, M., & Hanley, M.R. Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. Biological Pharmacology, 1995, 50, 137-146.
- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci., 1949, 51, 660-672.
- Seeburg, P.H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. TINS, 1993, 16, 359-365.
- Shamsuddin, A.M., Elsayed, A.M., & Ullah, A. Suppression of a large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. Carcinogenesis, 1988, 9, 577-580.
- Shamsuddin, A.M., & Ullah, A.M. Inositol hexaphosphate inhibits large intestinal cancer in F344 rats 5 months after induction by azoxymethane. Carcinogenesis, 1989, 10, 625-626.
- Shi, S.H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K., & Malinow, R. Rapid delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. Science, 1999, 284, 1811-1816.
- Shoepp, D.D., Jane, D.E., & Monn, J.A. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. Neuropharmacology, 1999, 38, 1431-76.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B., & Seeburg, P.H. Flip and Flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science, 1990, 249, 1580-1585.

- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., & Huganir, R.L. Interaction of the *N*-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. Neuron, 1998, 21, 393-400.
- Srivastava, S., & Ziff, E.B. ABP : a novel AMPA receptor binding protein. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1999, 868, 564-564.
- Srivastava, S., Osten, P., Vilim, F.S., Khatri, L., Inman, G., Statees, B., Daly, C., DeSouza, S., Abagyan, R., Valtchanoff, J.G., Weinberg, R.J., & Ziff, E.B. Novel anchorage to GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. Neuron, 1998, 21, 581-591.
- Standley, S., Tocco, G., Tourigny, M.F., Massicotte, G., Thompson, R.F., & Baudry, M. Developmental changes in alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation. Neurosci., 1995, 67, 881-892.
- Staubli, U., Larson, J., & Lynch, G. Mossy fiber potentiation and long-term potentiation involve different expression mechanisms. Synapse, 1990, 5, 333-335.
- Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J., & Heinemann, S.F. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. Neuron, 1994, 13, 1345-57.
- Takeuchi A. & Takeuchi N. Glutamate-induced depolarisation in crustacean muscle. Nature, 1963, 198, 490-1.
- Tocco, G., Massicotte, G., Standley, S., Thompson, R.F., & Baudry, M. Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections. Eur. J. Neurosci., 1992, 4, 1093-1103.
- Turrigiano, G.G. AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. Neuron, 2000, 26, 5-8.
- Uchino S., Sakimura K., Nagahara K. et Mishina M. Mutations in a putative agonist binding region of the AMPA-selective glutamate receptor channel. FEBS lett., 1992, 308, 253-257.
- Unanue, E.R., Ungewickell, D., & Branton D. The binding of clathrin triskelions to membrane from coated vesicles. Cell, 1981, 26, 439-446.
- Ungewickell, E., & Branton, D. Assembly units of clathrin coats. Nature, 1981, 289, 420-422.

- Van der Blick, A.M., & Meyerowitz, E.M. Dynamin-like protein encoded by *Drosophila* shibine gene associated with vesicle trafic. Nature (London), 1991, 351, 411-414.
- Vigers, G.P.A., Crowther, R.A., & Pearse, B.M.F. Location of the 100 kd 50 kd accessory proteins in clathrin coats. EMBO J., 1986, 5, 2079-2085.
- Vignes, M., & Collingridge, G.L. Synaptic activation of kainate receptor. Nature, 1997, 388, 179-182.
- Voglmaier, S.M., Keen, J.H., Murphy, J.-H., Ferris, C.J., Prestwich, G.D., Snyder, S.H., & Theibert, A.B. Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. Biochem. Biophys. Res. Commu., 1992, 187, 158-163.
- Vucenik, I., Tomazic, V.J., Fabian, D., & Shamsuddin, A.M. Antitumor activity of phytic acid (inositol hexaphosphate) in murine transplanted and metastatic fibrosarcoma, a pilot study. Cancer Lett., 1992, 65, 9-13.
- Wall, D.A., Wilson, G., & Hubbard, A.L. The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes. Cell, 1980, 21, 79-93.
- Wan, Q., Xiong, Z.G., Man, H.Y., Ackerley, C.A., Braunton, J., Lu, W.Y., Becker, L.E., MacDonald, J.F., & Wang, Y.T. Recruitment of functional GABA<sub>A</sub> receptors to postsynaptic domains by insulin. Nature, 1997, 388, 686-690.
- Wang, L.H., Rothberg, K.G., & Anderson, R.G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. J. Cell. Biol., 1993, 123, 1107-1117.
- Watkins, J.C., Krosgaard-Larsen, P., & Honore, T. Structure activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. Trends Pharmacol. Sci., 1990, 11, 25-33.
- Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A., & Bliss, T.V.P. Arachidonic acid induced a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. Nature, 1989, 341, 739-742.
- Wisden, W., & Seeburg, P.H. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. J. Neurochem., 1993, 13, 3582-98.
- Wo, Z.G., & Oswald, R.E. Unravelling the modular design of glutamate-gated ion channels. Trends Neurosci., 1995, 18, 161-8.
- Wo, Z.G., & Oswald, R.E. Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by *N*-glycosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 7154-8.

Wood, M.W., VanDongen, H.M.A., & VanDongen, A.M.J. Structural conservation of ion conduction pathways in K channel and glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4882-6.

Ziff, E.B. Recent excitement in the ionotropic glutamate receptor field. Ann. NY Acad. Sci., 1999, 868, 465-73.